

**IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS  
VON CARBOXYMETHYLCELLULOSEN AUF DIE  
PROLIFERATION, DIE ZYTOKINLIBERATION UND DIE  
BILDUNG FREIER SAUERSTOFFRADIKALE  
HUMANER KERATINOZYTEN**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Kerstin Trier

geboren am 01. Juli 1971 in Jena

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. med. U. Wollina**
- 2. Prof. Dr. med. P. Elsner**
- 3. Prof. Dr. med. M. Sticherling**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.01.2004**

*Meinen Eltern*

*Mit sich beginnen, aber nicht bei sich enden,  
bei sich anfangen, aber sich nicht selbst zum Ziel haben.*

*Martin Buber*

## **VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN**

A-T-Basenpaar	Adenin-Thymin-Basenpaar
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AFU	Absolute Fluorescence Units
BW	Basiswert
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMC	Carboxymethylcellulose
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Da	Dalton
DCF	Dichlorofluorescein
DCFH-DA	Dichlorofluorescein-Diacetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DS	Degree of Substitution
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FKS	Fetales Kälberserum
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
HaCaT	Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish-Peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IL	Interleukin
k	Kilo

m	Meter
μ	Micro ( $10^{-6}$ )
Mrd.	Milliarden
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMP 41	Nuclear Matrix Protein 41
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
OPD	O-Phenyl-diamin
p	Pico ( $10^{-12}$ )
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PPS	Pentosanpolysulfat
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
SFM	Serumfreies Medium
Tab.	Tabelle
TMB	Tetra-Methyl-Benzidin
TNF-α	Tumor Nekrosis Factor α
U/ min	Umdrehungen pro Minute

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b><u>Vorbetrachtungen</u></b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Phasen der Hautwundheilung</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Wundheilungsstörungen</b>	<b>5</b>
<b>2.3</b>	<b>Der Einfluss von Interleukinen auf Keratinozyten</b>	<b>6</b>
2.3.1	Interleukin-1	7
2.3.2	Interleukin-2R	7
2.3.3	Interleukin-6	8
2.3.4	Interleukin-8	9
<b>2.4</b>	<b>NMP 41</b>	<b>9</b>
<b>2.5</b>	<b>Freie Sauerstoffradikale</b>	<b>9</b>
<b>2.6</b>	<b>Funktionspolymere</b>	<b>10</b>
2.6.1	Polysaccharide - Funktionspolymere in der Natur	11
2.6.2	Molekulare und übermolekulare Struktur der Cellulose	12
2.6.3	Carboxymethylcellulose	13
<b>3.</b>	<b><u>Ziele der Arbeit</u></b>	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>HaCaT-Zellen</b>	<b>18</b>
4.1.1	Herkunft und Lagerung	18
4.1.2	Kultivierung und Vermehrung	18
4.1.3	Vitalitätsbestimmung von HaCaT-Zellen	20
4.1.4	Lagerung der Zellkulturüberstände	20
<b>4.2</b>	<b>Proliferation der HaCaT-Zellen - Quantitative Analyse</b>	<b>20</b>
4.2.1	Fluoreszenzmessung	20
4.2.2	Vorbereitung und Durchführung der Messung	20

<b>4.3</b>	<b>Messung von Interleukinen im Zellkulturüberstand</b>	21
4.3.1	Messung von Interleukinen mit dem Milenia <sup>®</sup> -Enzyme-Immunoassay	21
4.3.1.1	Vorbereitung der Messung	22
4.3.1.2	Messprinzip und Durchführung der Messung	22
4.3.2	Messung von Interleukinen mit dem IMMULITE <sup>®</sup> -System	23
4.3.2.1	Vorbereitung der Messung	23
4.3.2.2	Durchführung des Assays	23
<b>4.4</b>	<b>Bestimmung von NMP 41</b>	24
4.4.1	Vorbereitung der Messung	24
4.4.2	Durchführung der Messung	25
<b>4.5</b>	<b>Messung von freien Sauerstoffradikalen</b>	25
4.5.1	Vorbereitung der Messung	26
4.5.2	Durchführung der Messung	27
<b>4.6</b>	<b>Untersuchte Carboxymethylcellulosen</b>	27
<b>4.7.</b>	<b>Statistik</b>	28
<b>5.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	29
<b>5.1</b>	<b>Eichkurve zur Berechnung der Zellzahl</b>	29
<b>5.2</b>	<b>Wachstumsverhalten von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit</b>	30
<b>5.3</b>	<b>Bestimmung der für die Untersuchungen günstigen CMC-Konzentrationen und Versuchsdauer</b>	31
<b>5.4.</b>	<b>Der Einfluss von 5 verschiedenen Carboxymethylcellulosen in unterschiedlichen Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit</b>	32
<b>5.5.</b>	<b>Die Bestimmung von Interleukinen im Zellkulturüberstand</b>	38
5.5.1	Bestimmung von IL-1 $\beta$ im Zellkulturüberstand	39
5.5.2	Bestimmung von IL-2R im Zellkulturüberstand	39
5.5.3	Bestimmung von IL-6 im Zellkulturüberstand	40
5.5.4	Bestimmung von IL-8 im Zellkulturüberstand	41
<b>5.6</b>	<b>Die Bestimmung von NMP 41 im Zellkulturüberstand</b>	42
<b>5.7</b>	<b>Die Bestimmung von Freien Sauerstoffradikalen (ROS)</b>	42

<b>6.</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>46</b>
<b>6.1</b>	<b>Der Einfluss der Carboxymethylcellulosen auf die Proliferation von HaCaT-Zellen</b>	<b>46</b>
<b>6.2</b>	<b>Der Einfluss von Carboxymethylcellulose auf die Liberation ausgewählter Interleukine</b>	<b>50</b>
<b>6.3</b>	<b>Der Einfluss von Carboxymethylcellulose auf die Freisetzung von NMP 41</b>	<b>53</b>
<b>6.4</b>	<b>Der Einfluss von Carboxymethylcellulose auf die Bildung freier Sauerstoffradikale</b>	<b>54</b>
<b>7.</b>	<b><u>Schlussfolgerungen</u></b>	<b>56</b>
<b>8.</b>	<b><u>Abbildungen und Tabellen</u></b>	<b>57</b>
<b>9.</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>59</b>
<b>10.</b>	<b><u>Anhang</u></b>	<b>66</b>
	Danksagung	66
	Lebenslauf	67
	Ehrenwörtliche Erklärung	68



## **ZUSAMMENFASSUNG ZUR DISSERTATION**

# **IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON CARBOXYMETHYLCELLULOSEN AUF DIE PROLIFERATION, DIE ZYTOKINLIBERATION UND DIE BILDUNG FREIER SAUERSTOFFRADIKALE HUMANER KERATINOZYTEN**

Materialforschung mit medizinischer Applikation verfolgt zwei Hauptrichtungen: Zum einen die Entwicklung stabiler, den Angriffen von Körperzellen und -flüssigkeiten standhaltende Materialien (z. B. für Zahn- oder Knochenprothesen bzw. Implantate). Zum anderen werden biokompatible, biologisch abbaubare Materialien entwickelt, die sich durch eine gerichtete Bioaktivität auszeichnen. Beispiele für solche Anwendungen liegen im Tissue Engineering und der Wundbehandlung.

In der vorliegenden Dissertation wird das Biomaterial Carboxymethylcellulose (CMC) untersucht, welches zum Beispiel in der Wundbehandlung Anwendung findet. Carboxymethylcellulose ist biokompatibel, biologisch abbaubar und als adjuvanter quellfähiger Bestandteil in diversen Hydrokolloid-Verbindungen erprobt. Ziel der Arbeit ist es, die Bioaktivität humaner Keratinozyten auf CMC zu untersuchen.

Wir verwendeten fünf Carboxymethylcellulosen unterschiedlichen Substitutionsgrades. Die Untersuchungen wurden an der spontan immortalen humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT (40. bis 55. Passage) durchgeführt.

Das Proliferationsverhalten der HaCaT-Zellen wurde mit Hilfe des Fluoreszenz-Messsystems CytoFluor 2300 der Fa. Millipore unter Verwendung des Farbstoffs 33342 der Fa. Hoechst beurteilt. In zahlreichen Versuchsreihen konnten wir feststellen, dass sich die Zugabe von CMC insgesamt positiv auf die quantitative Vermehrung der Zellen auswirkte und in Einzelfällen Proliferationssteigerungen um bis zu 500 % erreicht wurden.

In Hinblick auf das Proliferationsverhalten der untersuchten HaCaT-Zellen kamen wir zu den folgenden Ergebnissen:

- Das Proliferationsverhalten der Keratinozyten ist abhängig von der jeweils verwendeten **CMC**.
- Die quantitative Vermehrung der Keratinozyten ist vom **Substitutionsgrad** (Degree of Substitution = DS) der jeweiligen Carboxymethylcellulose abhängig. Bei

gleichem CMC-Ausgangsstoff nimmt mit steigendem Substitutionsgrad der CMC die Proliferationsfreudigkeit der Zellen ab.

- Die Zunahme der Keratinozyten-Wachstumsrate ist abhängig von der verwendeten **Konzentration** der in serumfreiem Medium gelösten Carboxymethylcellulosen, mit steigender CMC-Konzentration nimmt auch die Proliferationsrate zu.
- Die quantitative Vermehrung der Keratinozyten ist von der **Zeit** abhängig, eine längere Inkubationsdauer der HaCaT-Zellen mit Carboxymethylcellulose bewirkt vergleichsweise eine Proliferationszunahme.

Untersuchungen zum Einfluss der Carboxymethylcellulose auf die Expression der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 sowie den IL-2-Rezeptor mit dem Milenia<sup>®</sup>-Enzyme-Immunoassay und dem Chemiluminiszenz-Immunoassay-System IMMULITE<sup>®</sup> der Fa. DPC Biermann belegen zusätzlich die wachstumsfördernden Wirkungen der CMC auf humane Keratinozyten.

Mit dem Matri-Tect<sup>™</sup> NMP 41<sup>™</sup> Cell Death Test Kit, einem enzymatischen Immunoassay, konnten wir zeigen, dass die untersuchten Carboxymethylcellulosen keine zytotoxischen Eigenschaften aufweisen.

Bei der abschließenden Bestimmung freier Sauerstoffradikale (Reactive Oxygen Species = ROS) ließ sich ein direkter Zusammenhang zwischen vorhandener Zellzahl und der Menge an produzierten ROS nachweisen, so dass wir davon ausgehen, dass die untersuchten Carboxymethylcellulosen nicht als schädigende Stressfaktoren auf die Zellen wirken.

Sie sind somit interessante Biomoleküle für einen Einsatz im Tissue Engineering und bei der Förderung der Wundheilung.

## 1. EINLEITUNG

Bereits seit einem guten Jahrhundert beschäftigt sich die Wissenschaft intensiv mit dem Mechanismus der Wundheilung. Dieser auf den ersten Blick fast elementar und simpel erscheinende Vorgang rückt erst bei Störungen ins engere Blickfeld. Kann geschädigte Haut ihre Funktionen bei der Heilung nicht mehr erfüllen, muss in vielen Fällen, vor allem bei chronischen Wunden, an einen temporären Hautersatz gedacht werden. An diesen sind Grundanforderungen wie Funktionalität, Biokompatibilität, ausreichende Verfügbarkeit und ein günstiges Preis-Leistungs-Verhältnis zu stellen.

Obwohl die zur Zeit verfügbaren Produkte schon viele Fortschritte auf dem Gebiet der Wundheilung brachten - der ideale Hautersatz konnte bis jetzt noch nicht gefunden werden.

In den 70er Jahren zeigten Rheinwald und Green (1975) Möglichkeiten auf, epidermale Hautzellen in dünnen Schichten in vitro zu kultivieren. In den folgenden Jahren wurden eine Vielzahl von sowohl epidermalen als auch dermalen Hautäquivalenten für Wunden aller Art hergestellt. Probleme ergaben sich dabei vor allem aus der Fragilität des Transplantates, dessen Anfälligkeit für Scherkräfte und bakterielle und enzymatische Angriffe sowie der möglichen Abstoßung des Transplantates bei dem Empfänger (Lafrance und Armstrong, 1999).

Im Rahmen der Wundbehandlung sind eine Reihe von weiteren speziellen Anforderungen an einen zeitgemäßen Wundverband zu stellen. Er soll bioaktiv reagieren, muss also biologische Prozesse wie Granulation, Epithelisation, immunologische und nichtimmunologische Abwehr, Proliferation, Migration und Differenzierung gezielt beeinflussen und sich an die sich ständig ändernden Gegebenheiten des Wundmilieus anpassen können (Wollina, 1995).

Neuere Ansätze für die Entwicklung von Wundverbänden bzw. Hautersatzprodukten kombinieren Elemente der Zelltherapie mit denen aus dem Gebiet des Tissue Engineerings.

Tissue Engineering ist ein noch junges Forschungsgebiet und eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts, dessen Endziel die Regenerierung komplexer Gewebe ist.

Tissue Engineering auf dem Gebiet der Wundheilung beinhaltet die Entwicklung von Produkten, die lebende Zellen und Biomaterialien kombinieren, lebende Zellen als therapeutische oder diagnostische Reagenzien nutzen und funktionelle Biomaterialien für biospezifische Gewebeinteraktionen verwenden.

Das Biopolymer Cellulose ist ein für Wundtherapie und temporären Hautersatz interessanter Rohstoff.

Veröffentlichungen brasilianischer Wissenschaftler deuteten bereits darauf hin, dass Cellulose bzw. ihre Derivate als temporärer Hautersatz geeignet sein könnten (Fontana et al., 1990, 1991).

Cellulose ist biokompatibel, biologisch abbaubar und hydrophil, was wichtige Voraussetzungen für eine Nutzung als Wundverband sind. Darüber hinaus hat sie den Vorteil, ein ständig nachwachsender Rohstoff zu sein, so dass dem steigenden Bedarf an biokompatiblen Materialien kostengünstig und umweltfreundlich Rechnung getragen werden kann. Carboxymethylcellulose, deren Ausgangsstoff Cellulose ist, findet in Nahrungsmitteln sowie in verschiedenen kosmetischen Zubereitungen Anwendung. Auf dem Gebiet der Pharmazeutik benutzt man Carboxymethylcellulose unter anderem als quellfähigen Bestandteil in diversen Hydrokolloid-Verbinden bei der Therapie moderat bis stark exsudierender Wunden.

Am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena sind Cellulose und vor allem auch Carboxymethylcellulose aktuelle Forschungsschwerpunkte. In enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. rer. nat. habil. Thomas Heinze untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die Bioaktivität humaner Keratinozyten auf Carboxymethylcellulose in vitro.

## 2. VORBETRACHTUNGEN

### 2.1 Phasen der Hautwundheilung

Eine Wunde ist eine mit Substanzverlust einhergehende Gewebedurchtrennung der äußeren Haut, der Schleimhäute oder der Oberfläche von Organen. Sie kann mechanisch (z. B. Schnittwunde), ischämisch (z. B. Infarkt) oder auch entzündlich (z. B. Abszess) entstanden sein und löst die Bildung von Ersatzgewebe aus.

Jede Wunde durchläuft eine Abfolge verschiedener Prozesse im Organismus, die dem Ziel dienen, den Defekt wieder zu verschließen. Dieses komplexe dynamische Geschehen verläuft in verschiedenen Phasen, in denen Material abgebaut wird (katabole Phase) und aufgebaut wird (anabole Phase). In der Wundheilung spielen zelluläre, biochemische, zeitliche und räumliche Aspekte eine jeweils wichtige Rolle.

Unabhängig von der Art der Wunde unterscheidet man nach Riede und Schaefer (1995) vier Phasen der Wundheilung, die ineinander übergehen: eine exsudative bzw. inflammatorische, eine resorptive, eine proliferative und eine regenerative Phase.

**Exsudative Phase:** Die frische Wunde füllt sich mit einem Wundsekret aus Blut und Lymphe, die aus verletzten Gefäßen und Gewebsspalten einfließen. Im thrombokinasereichen Milieu der Wunde gerinnt das im Wundsekret enthaltene Fibrinogen zum sogenannten Wundschorf. Die erfolgte Traumatisierung des Gewebes bewirkt in der Dermis eine alternative Entzündung, die durch lokale Entzündungsmediatoren ausgelöst wird. Durch die Entzündung wird der Blutstrom in den nicht verletzten Gefäßen der Wundränder verlangsamt, das betroffene Gebiet wird hyperämisch. Des weiteren wird zur Unterstützung der molekularen Infektabwehr ein seröses Exsudat mit Immunglobulinen in das Wundbett abgegeben.

**Resorptive Phase:** Unter dem Einfluss des aktivierten Komplementsystems wandern neutrophile Granulozyten in das Wundgebiet ein, die vorhandene Erreger im Rahmen der zellulären Infektabwehr phagozytieren und abtöten sollen. Des weiteren sind nun auch Monozyten, die sich zu Histiozyten umwandeln und Lymphozyten zu finden.

Durch den enzymatischen Abbau von Infektionserregern und von zerstörtem Gewebe bildet sich im Wundrandbereich eine Schädigungsazidose aus, die Proteasen aktiviert und die Exsudation des als Nährmedium für einwandernde Fibroblasten wichtigen Plasmas fördert.

***Proliferative Phase:*** Durch ein Absenken des pH-Wertes im Wundgebiet wird in dieser Phase die Heilung beschleunigt. Am Ende der Entzündungsphase wird durch die Proliferation ortsständiger Fibroblasten die Bildung eines Granulationsgewebes angeregt. Im Zentrum der Wunde entsteht ein Sauerstoffdefizit infolge der katalytischen Stoffwechselvorgänge, das mit Unterstützung von Wachstumsfaktoren ein Einwuchern von Kapillaren ins Wundgebiet bewirkt.

***Reparative Phase:*** Der Gewebsdefekt ist nun durch Granulationsgewebe vollständig verschlossen, und die Fasersynthese und Bindegewebsneubildung setzt ein, um die notwendige mechanische Stabilität zu gewährleisten.

Neben der reparativen Bindegewebsneubildung ist auch die nun ablaufende reparative Epithelialisierung des Defektes von Bedeutung, welche in der Epidermis mit der epithelialen Migrationsphase beginnt.

Ihren Ausgang nimmt die Epithelialisierung an den Wundrändern, sofern es sich bei der vorliegenden Wunde um einen Defekt aller Epidermisschichten handelt. Ist die Basalzellschicht erhalten geblieben, kann die gesamte Wundfläche allein durch Mitosen der verbliebenen Zellen mit anschließender Differenzierung und Maturation der Epidermis reepithelialisiert werden.

***Epitheliale Migrationsphase:*** Die primär intakte Epidermis setzt sich aus einem Zellverband zusammen, der mit Hilfe von Interzellularbrücken und Tonofilamenten Zugfestigkeit erhält.

Ungefähr 3 Tage nach einer Verletzung lockern sich durch den Einfluss des Plättchenwachstumsfaktors (Platelet derived growth factor) und sogenannter Zerstreuungsfaktoren aus Fibroblasten (Scatter factor) die Zellverbindungen der basal sitzenden Stachelzellen im Wundrandbereich. Die Keratinozyten bilden in ihrem Zytoplasma periphere Aktinfilamente, und Tonofilamente retrahieren sich in den Zellen, so dass die Voraussetzungen für die Migration geschaffen sind. Keratinozyten wandern amöboid entlang der Wundränder und unter dem Wundschorf auf einer „provisorischen Basalmembran“, einem Fibronektin-Fibrinfilz. Diese wird noch während der Epithelzellwanderung in die endgültige Basalmembran umgewandelt, indem sie Typ-IV-Kollagen und Laminin produziert.

12 - 48 h nach der Wundsetzung nimmt die mitotische Aktivität der Basalzellen in der Wundumgebung zu. Eine Stimulierung dieser Mitosen erfolgt durch verschiedene Wach-

stumsfaktoren wie z. B. den Epidermal growth factor (EGF) und den Fibroblast growth factor (FGF), die sowohl Einfluss auf die Epithelialisierung als auch auf die Granulation haben. Eine weitere mitogene Substanz ist das Interleukin-1 (IL-1), welches T-Lymphozyten aktiviert, die daraufhin Interleukin-2 freisetzen. IL-2 aktiviert T- und B-Lymphozyten aber auch Granulozyten, Monozyten und Natural killer cells. Darüber hinaus stimuliert es die Fibroblastenproliferation. Die Keratinozyten proliferieren unter dem Einfluss dieser Wachstumsfaktoren, bis der Defekt in Dermis und Subkutis verschlossen ist.

*Epitheliale Rückbildungsphase:* Nach abgeschlossener Reepithelialisierung des ehemaligen Wundgebietes wird die epitheliale Zellproliferation infolge Kontaktinhibition beendet. Jetzt sind auch die zugfesten Interzellularbrücken wieder zu finden.

Die hypertrophe Epidermis im ehemaligen Wundbett bildet sich zu einer normalen Schichtdicke und Zellanordnung zurück, der Gehalt der Keratinozyten an Glycogen, RNS und DNS nimmt zu, und die Keratinozyten an der Oberfläche beginnen wieder, Keratin zu bilden.

*Narbenphase:* Das Ergebnis einer abgeheilten Hautwunde ist eine Narbe, die abhängig von primär oder sekundär erfolgter Wundheilung von strichförmig unauffällig und ohne funktionelle Beeinträchtigung bis hin zu breiten, kosmetisch ungünstigen Narben mit möglichen Funktionseinschränkungen reichen kann.

Hautzellen (Keratinozyten) entwickeln im Wundheilungsprozess eine Vielzahl überaus wichtiger Aktivitäten. So sind sie für die Ausbildung einer neuen Epidermis verantwortlich und sezernieren biologisch aktive Substanzen, wie vasoaktive Mediatoren, Wachstumsfaktoren, Proteasen und andere Enzyme sowie strukturelle Makromoleküle.

## **2.2 Wundheilungsstörungen**

Durch verschiedene Faktoren wie Diabetes mellitus, Hyperkortizismus, Ernährungsstörungen, Durchblutungsstörungen, Blutgerinnungsstörungen oder verschiedene Medikamente (z.B. Glukokortikoide, Zytostatika, Cyclosporin und Penicillamin) kann es zu Komplikationen der Hautwundheilung kommen. Unter diesen Störfaktoren ist die physiologische Hautalterung besonders hervorzuheben, denn auch die Hautzellen ändern mit zunehmender

dem Alter des Individuums ihre Generationszeit, so dass neben verminderter Wundkontraktion, Zellproliferation, Kapillarneubildung und Zahl der vorhandenen Mastzellen auch die gesamte Epithelialisierung verlangsamt ist, und Keratinozyten weniger auf mitogene Reize reagieren.

Eine schlecht heilende Wunde ist dadurch charakterisiert, dass kein bzw. nur ein mangelhafter Wundverschluss vorliegt, oder die Heilung nur sehr langsam erfolgt. Weitere Hinweise für Wundheilungsstörungen sind Detritus, Eiter, Zeichen arterieller Minderdurchblutung oder venöser Abflussstörung, Vaskulitiden und Wundinfektionen.

Von einer chronischen Wunde spricht man, wenn eine Wunde nicht innerhalb der physiologischen Abheilzeit von etwa 2 - 3 Wochen verheilt ist, mit Ausnahme besonders großflächiger Wunden.

Klinisch haben chronische Wunden ihre Ursache vor allem in venösen, arteriellen oder gemischt- vaskulären Komplikationen bzw. können sie auch als neuropathische Wunden oder als Druckgeschwüre auftreten.

Bei chronischen Wunden stehen vor allem proliferativ- entzündliche Vorgänge mit Rötung, Epidermisverdickung, Schuppung oder Lichenifikation im Vordergrund der krankhaften Hauterscheinungen.

Statistischen Erhebungen zufolge werden zur Zeit etwa 2 Millionen Amerikaner aufgrund eines Dekubitus behandelt, ca. 2 Millionen Deutsche leiden an Venenerkrankungen mit der ständigen Gefahr einer Ulcus-cruris-Entwicklung.

## **2.3 Der Einfluss von Interleukinen auf Keratinozyten**

Interleukine spielen eine wichtige Rolle im Wundheilungsprozess. Für die Steuerung der Entzündungsreaktionen ist ein überaus komplexes Netzwerk von verschiedenen Interleukinen verantwortlich, wie z. B. der Interleukine 1, 6 und 8.

Interleukine sind definierte biologisch aktive Substanzen, die der interzellulären Kommunikation dienen. Seit 1979 (vgl. Friemel, 1990) existiert der Begriff Interleukin, welcher damals in erster Linie geprägt wurde, um etwas mehr Übersichtlichkeit in die große Anzahl an Cytokinen zu bringen.



### 2.3.1 Interleukin-1

IL-1 ist ein inflammatorisches Cytokin, welches hauptsächlich von aktivierten Makrophagen/ Monozyten und peripheren Neutrophilen, aber auch von anderen Zellen wie glatten Muskelzellen, Astrozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen gebildet wird. Es wirkt als lokales und systemisches interzelluläres Signal bei Immun- und Entzündungsreaktionen. Es gibt zwei biologisch aktive Formen: IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , welches beim Menschen deutlich überwiegt.

Die Synthese von IL-1 kann durch eine Kombination von anderen Cytokinen, Endotoxinen, Viren, Mitogenen und Antigenen induziert werden.

IL-1 mediert zahlreiche biologische Aktivitäten. Beispielsweise stimuliert es die Produktion und Sekretion von IL-2, IL-6 und IL-8 sowie die Expression des IL-2-Rezeptors auf T-Zellen. Außerdem fördert es die Aktivierung und Differenzierung von NK-Zellen, Fibroblasten und Thymozyten. IL-1 wirkt des weiteren antiproliferativ auf einige Tumorzelltypen, steigert die Tumor-Zytotoxizität von Makrophagen und induziert Tumor-Regression. Weiterhin spielt es eine Rolle im Knochenstoffwechsel, hat verschiedene Effekte im Zentralen Nervensystem und wirkt als endogenes Pyrogen beim Menschen. Zusätzlich induziert es die Synthese von ACTH, Endorphin, Vasopressin und Somatostatin.

Außerdem wurde in Untersuchungen festgestellt, dass IL-1 die Proliferation von Keratinozyten in Zellkulturen stimulieren kann. Kondo und Ohshima (1996) sowie Wang et al. (1997) und weitere Autoren wiesen nach, dass sofort nach dem Induzieren einer Hautwunde die IL-1 $\beta$ -Expression in den Keratinozyten rapide ansteigt und IL-1 $\beta$  demzufolge eine wichtige Rolle in der frühen inflammatorischen Phase spielt.

### 2.3.2 Interleukin-2R

Auch der Rezeptor des Cytokins IL-2 spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunantwort. Die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor auf der Oberfläche von T-Lymphozyten triggert einen Ausstoß von intrazellulären Signalen, der in eine Aktivierung und Proliferation von ruhenden T-Zellen sowie in die Generation von Helfer-, Suppressor- und zytotoxischen T-Zellen mündet, welche Immunreaktionen mediierten.

IL-2R kann also als Marker für Erkrankungen mit erhöhter Lymphozyten-Aktivität, wie sie zum Beispiel auch bei allergischen Erkrankungen auftreten, verstanden werden. Gebhardt

et al. (1997) beobachteten bei Patienten mit Atopischem Ekzem und erhöhtem Serum-IgE signifikant erhöhte IL-2R-Level.

Außerdem ist IL-2R in geringer Menge im Serum gesunder Individuen vorhanden, in größerer Menge jedoch bei vielen Erkrankungen wie beispielsweise Neoplasmen, Autoimmunerkrankungen, allergischen Erkrankungen und verschiedenen Infektionskrankheiten.

### **2.3.3 Interleukin-6**

IL-6 gilt als typisches Beispiel für ein multifunktionelles Cytokin. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Infektion, Entzündung und Gewebsschaden durch Erhöhung der Immunabwehr, durch Induktion von Akute-Phase-Reaktionen und durch Stimulation der Hämatopoese.

IL-6 ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 20 - 30 kDa. Es wird von vielen verschiedenen Zellen im Organismus synthetisiert, z. B. Monozyten/ Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Osteozyten, T- und B-Zellen - um nur einige zu nennen. Im Gegensatz zu bestimmten Tumorzellen, die kontinuierlich IL-6 produzieren, bilden normale Zellen nur bei entsprechender Stimulation IL-6. Positive Stimuli sind unter anderem Lipopolysaccharide, verschiedene Viren und Bakterien, Platelet derived growth factor (PDGF), IL-1 und Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Im Gegensatz dazu supprimiert IL-6 die IL-1- und TNF- $\alpha$ -Produktion (Schindler et al., 1990). Unter bestimmten Bedingungen kann IL-6 auch seine eigene Produktion selbst induzieren (Shabo et al., 1989). Des weiteren ist auch IL-4 fähig, die Bildung von IL-6 speziell in Keratinozyten und Endothelzellen positiv zu stimulieren (Howells et al., 1991; Colotta et al., 1992).

Es wurde nachgewiesen, dass IL-6, abhängig vom jeweiligen Zelltyp, fördernde, inhibierende oder auch keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten haben kann. Grossmann et al. (1989) beobachteten einen positiven Effekt von IL-6 sowohl auf das Wachstum psoriatischer Keratinozyten, als auch auf Keratinozyten in Zellkulturen (Yoshizaki et al., 1990).

Physikochemische Einflüsse, wie z. B. thermische Verletzungen und ultraviolette Strahlung führen zu einer verstärkten Produktion von IL-6 durch die Haut (Kirnbauer et al., 1991).

### **2.3.4 Interleukin-8**

Interleukin-8 zeigt vor allem stimulatorische Wirkung auf neutrophile Granulozyten und auf T-Lymphozyten. Es gilt als ein Faktor der lokalen Entzündung, als Signal der Neutrophilen-Emigration vom Blut ins Gewebe (Friemel, 1990; Wang, 1997). Induziert wird die IL-8-Synthese beispielsweise durch Endotoxine, IL-1, IL-3, IL-6 sowie TNF- $\alpha$  und findet vor allem in Monozyten/ Makrophagen, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen statt. Bei entzündlichen Prozessen wie Psoriasis, Arthritis oder Pneumonie bewirkt IL-8 die Akkumulation der Granulozyten.

## **2.4 NMP 41**

Das Nuclear Matrix Protein 41 (NMP 41) ist ein Kernmatrixprotein toter bzw. sterbender Zellen. Durch die Messung von NMP 41 werden Aussagen über eventuelle zytotoxische Eigenschaften der untersuchten Carboxymethylcellulosen bzw. auch über in Gang gesetzte Apoptosevorgänge möglich.

Arguello et al. (1996) zeigten beispielsweise, dass NMP 41 auch als ein nützlicher Marker für die quantitative Erfassung von Krankheitsschwere und Behandlungserfolg bei SCID-Mäusen mit Leukämie betrachtet werden kann.

## **2.5 Freie Sauerstoffradikale**

Freie Sauerstoffradikale (Reactive Oxygen Species = ROS) sind wichtige Zwischenprodukte sowohl im physiologischen als auch im pathologischen oxidativen Zellstoffwechsel. Dabei unterscheidet man Hydroxylradikale ( $\cdot\text{HO}$ ) vom Superoxidanionenradikal ( $\cdot\text{O}_2$ ) und dem Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Bei einer Überproduktion tragen sie zur Zellzerstörung durch Lipidperoxidation sowie zur Zerstörung von Proteinen und Enzymen bei. Untersuchungen von Goldman et al. (1998) belegen, dass verschiedene Cytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren die Radikalbildung beeinflussen. Außerdem gelten sie als Second messengers bei der Aktivierung von Enzymen und Transkriptionsfaktoren, bei Differenzierungsvorgängen während des Zellwachstums und bei der Apoptose. Fu et al. (2000) wiesen auch auf eine gesteigerte Apoptoserate bei Keratinozyten durch erhöhte ROS-Mengen hin.

Stehen die Zellen eines Organismus unter Stress, z. B. bei ionisierender/ ultravioletter Bestrahlung, Ischämie oder bei Entzündungen, kommt es zur exzessiven Bildung von freien Sauerstoffradikalen.

Durch an Entzündungsprozessen beteiligte Zellen, wie z. B. neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Makrophagen, können aus Sauerstoff durch Reduktion die Sauerstoffradikale (Superoxidanion, Wasserstoffsuperoxid, Hydroxylradikale) freigesetzt werden.

Diesen Sauerstoffradikalen ist es möglich, als potente zytotoxische Verbindungen bei entzündlichen Reaktionen, Alterungsprozessen der Zellen, in der Karzinogenese und bei neuropathologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson wirksam zu werden.

Es gibt verschiedene Verfahren die Bildung freier Sauerstoffradikale quantitativ zu bestimmen. Neben Analysen mittels Chemiluminiszenz werden auch Verfahren angewandt, die mit Fluoreszenzmethoden arbeiten.

## **2.6 Funktionspolymere**

Funktionspolymere sind Produkte, die sich von den klassischen Werkstoff- und Faserpolymeren vor allem in zwei Punkten unterscheiden. Sie unterstützen oder ermöglichen technische und biomimetische Prozesse, wobei sie häufig an Grenzflächen wirken, und sie treten in der vollen Breite der möglichen Strukturen in der Polymerenchemie auf (Winkler, 1996). Für Funktionspolymere typische Funktionen sind Dispergierung, Haftung, Schutz, Agglomeration, Adsorption und Viskositätsbeeinflussung sowie Aufgaben, die besondere elektrische, optische, mechanische Eigenschaften und spezielles supramolekulares Strukturbildungsvermögen erfordern. Ihre Wirksamkeit beruht meist auf dem Zusammenwirken von Eigenschaften des jeweiligen Polymerrückgrates und entsprechender funktioneller Gruppen wie Säuren, Basen, hydrophile und hydrophobe Gruppen.

Biopolymere wie Polysaccharide, natürliche Kautschuke, Proteine und Nukleinsäuren und Lignine werden Jahr für Jahr von der Natur im Pflanzen- und im Tierreich in gewaltiger Menge produziert. Allein an pflanzlicher Biomasse fallen jährlich ca. 170 Mrd. Tonnen an. Diese Naturpolymere sind häufig sehr sinnreiche Verbundwerkstoffe, die im Hinblick auf ihre natürlichen Aufgaben optimiert worden sind. Diese Synthesevorleistung der Natur gilt es, für das Design von Funktionspolymeren der Zukunft gezielt zu nutzen.

### 2.6.1 Polysaccharide - Funktionspolymere in der Natur

Polysaccharide sind natürlich vorkommende Kohlenhydrat-Polymere, in denen die Monosaccharid-Bausteine durch glykosidische Bindungen verknüpft sind. Gemeinsam mit den Nukleinsäuren und Proteinen, dem Lignin und Polyisopren sowie weiteren biogenen Makromolekülen bilden sie die Klasse der wichtigen polymeren Naturstoffe.

Polysaccharide und polysaccharidhaltige Materialien werden von allen Polymeren mengenmäßig am häufigsten biosynthetisch erzeugt und kommen sowohl in Pflanzen als auch in Tieren und Mikroorganismen vor. Ihre vielfältigen Funktionen in der Natur reichen von der mechanischen Gerüst- und Stützfunktion in den Zellwänden von Pflanzen, Mikroorganismen und Tieren über physikalisch-chemische bei der Regulation des osmotischen Drucks, der Ausbildung von Gelen und Schleimkapseln oder der Energiespeicherung im pflanzlichen und tierischen Organismus bis hin zur biologischen Wirkung von immunologisch aktiven Exopolysacchariden (Burchard, 1985; Hergenrother, 1985; Elias, 1990; Franz, 1991).

Natürliche ionische Polysaccharide weisen eine Vielzahl interessanter und praktisch bedeutsamer Eigenschaften auf, wobei die überwiegend anionischen Gruppen wesentlich sind. Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit, praktisch unerschöpfliche Vorräte, Wasserlöslichkeit und Beeinflussung der Rheologie der Lösungen, Ionentransport und -bindung, Gel- und Symplexbildung, biologische Aktivität und vieles mehr deuten die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten dieser Makromoleküle an.

So gewinnen Polysaccharide wie zum Beispiel Alginate, Chitin, Dextran und Cellulose als Funktionspolymere zunehmend wissenschaftliche und praktische Bedeutung.

Im Gegensatz zu den eben genannten Biopolymeren ist Cellulose molekular einfach und sehr einheitlich aus glycosidisch verknüpften Anhydroglucose-Bausteinen aufgebaut. In den Wiederholungseinheiten liegen primäre und sekundäre Hydroxylgruppen vor, die zur Ausbildung eines geordneten Netzwerkes von Wasserstoffbrücken befähigt sind und eine Vielzahl supramolekularer Strukturen und Morphologien ausbilden. Natürliche cellulose Verbundmaterialien mit Lignin, wie Hölzer, Fruchtschalen, Flachs und Kakteenstacheln, zeigen hervorragende und vielfältige Materialeigenschaften, die von synthetischen Hochleistungsmaterialien kaum erreicht werden. Cellulose nimmt außerdem durch ihre Menge eine herausragende Position ein – sie ist mit einer jährlichen Bildungsrate von etwa  $10^{11}$  Tonnen das am häufigsten vorkommende organische Polymer und der wichtigste nachwachsende Rohstoff auf der Erde.

Bei der Biosynthese von Cellulose wird in großem Umfang  $\text{CO}_2$  aus der Atmosphäre gebunden. Das Polymer ist multichiral, biokompatibel und biologisch abbaubar und findet heute wieder zunehmend praktisches und wissenschaftliches Interesse als alternative Rohstoffquelle zur Lösung der globalen Umwelt- und Ressourcenprobleme (Rogowin und Galbraich, 1983; Tarchevsky und Marchenko, 1991; Eierdanz, 1996).

Die Optimierung der Struktur von in lebenden Organismen gebildeten Polysacchariden mit Hilfe der Gentechnologie erscheint ebenfalls aussichtsreich. Allerdings können das Potential und mögliche Gefahren heute nur schwer abgeschätzt werden. In der Bundesrepublik Deutschland erlaubt die Gesetzeslage bisher keine breite Anwendung.

Das Problem, das aus der teilweise drastischen Variation der Primärstruktur ein und desselben Polysaccharides durch die natürlichen Bildungsbedingungen sowie die Isolations- und Reinigungsverfahren bedingt ist, stellt aus chemischer Sicht ein intensiv bearbeitetes Forschungsanliegen dar. So wird versucht, maßgeschneiderte und reproduzierbare Strukturen aus den natürlichen Vorkommen zu gewinnen, welche dann auch industriell in großem Maßstab genutzt werden können.

### **2.6.2 Molekulare und übermolekulare Struktur der Cellulose**

Sowohl für die Synthese neuer einheitlicher Cellulosederivate als auch für den Aufbau geordneter Strukturen ist die genaue Kenntnis des Naturstoffs Cellulose und seiner Morphologie entscheidend. Aus chemischer Sicht ist Cellulose eine Substanz definierter Konstitution. Sie ist ein lineares Homopolymer, das aus regio- und enantioselektiv  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidisch verknüpften Anhydroglucose-Einheiten aufgebaut ist. Die Wiederholungseinheit dieses isotaktischen Polyacetats ist die  $\beta$ -Cellobiose.

Die Pyranose-Ringe liegen in der  ${}^4\text{C}_1$ -Sesselform vor, wodurch der geringste Energiegehalt realisiert ist. Je Wiederholungseinheit sind 3 Hydroxylgruppen an den C-2, C-3 und C-6 Atomen vorhanden, die prinzipiell die typischen Reaktionen von sekundären und primären alkoholischen OH-Gruppen eingehen können. Die vizinalen sekundären OH-Gruppen repräsentieren eine Glykolstruktur. Die Brücken- und Ringsauerstoffatome sind vorwiegend in übermolekulare Wechselwirkungen - insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen - einbezogen und spielen bei Abbaureaktionen des Polymers eine Rolle.

Die drei Hydroxylgruppen der Wiederholungseinheit können - wie bereits erwähnt - prinzipiell die typischen Reaktionen von primären und sekundären Hydroxylgruppen eingehen. Das Ausmaß der Umsetzung an den Hydroxylgruppen wird durch den Substitutionsgrad

(Degree of Substitution = DS) beschrieben. Dieser Durchschnittswert gibt ohne jede Differenzierung die Anzahl der substituierten Hydroxylgruppen an und liegt dementsprechend für Cellulose, deren terminale Einheiten mit vier Hydroxylgruppen mengenmäßig nicht in das Gewicht fallen, definitionsgemäß zwischen 0 und 3.

### 2.6.3 Carboxymethylcellulose

Natrium-Carboxymethylcellulose ist ein neutraler anionischer Polyelektrolyt, der durch die Reaktion von Alkalicellulose mit Chloressigsäure großtechnisch hergestellt wird. Die weltweite jährliche Produktion schätzt man auf etwa 300 000 Tonnen. Die Natriumsalzform der Carboxymethylcellulose, meist einfach als CMC und in sehr reiner Form als „Cellulosegum“ bezeichnet, ist löslich in kaltem und in warmem Wasser. Die Verteilung der Substituenten sowie der Substitutionsgrad lassen sich in weitem Umfang variieren und bestimmen die produktspezifischen Eigenschaften. Die Handelsprodukte sind weiße bis schwach gelbliche, geruchs- und geschmacksneutrale Pulver oder Granulate. Sie sind lichtbeständig und in fester Form unbegrenzt lagerfähig. Außerdem sind sie in reiner Form physiologisch unbedenklich, wie pharmakologische und toxikologische Untersuchungen bestätigt haben (vgl. Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, 1975). Die Fähigkeit der wasserlöslichen Carboxymethylcellulosen, wässrige Systeme in vielfältiger Weise zu beeinflussen, macht sie unentbehrlich als funktionelle Zusatzstoffe in einer Fülle von Produkten und auf einer Vielzahl von Anwendungsgebieten. Große Mengen der CMC werden in der Papier- und Textilindustrie, als Detergenz und als Bohrhilfsmittel in der Erdölförderung eingesetzt. Die gereinigten Produkte finden Anwendung in Nahrungsmitteln sowie pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen (Tab. 1). Auf dem Gebiet der Pharmazeutik benutzt man Carboxymethylcellulose unter anderem als Sprengmittel bei der Herstellung von Tabletten (z. B. Buscopan<sup>®</sup> plus Filmdoublette) und als Fließeigenschaften beeinflussender Inhaltsstoff von Augen- und Nasentropfen (z. B. Liquifilm<sup>®</sup>, Tränenersatzmittel). Auch als Trägergel für topische Anwendungen (z. B. Diclofenac<sup>®</sup>-Gel) ist CMC gut geeignet (Mohammed, 2001). CMC spielt als quellfähiger Bestandteil in diversen Hydrokolloid-Verbindungen (z. B. Aquacel<sup>®</sup>, Fa. ConvaTec Ltd.) eine wichtige Rolle. Diese Wundverbände werden vor allem bei der Therapie moderat bis stark exsudierender Wunden eingesetzt und zeichnen sich durch eine relativ hohe Sicherheit, Effektivität und gute Toleranz durch die Patienten aus, wie unter anderem Veröffentlichungen von Piaggese et al. (2001) und Williams (1999) belegen. Waring et al. (2001) untersuchten die allgemei-

nen physiko-chemischen Eigenschaften von Carboxymethylcellulose und stellten fest, dass durch die Fähigkeit der CMC zur Gelbildung Flüssigkeit immobilisiert wird, was bei der Wundbehandlung Vorteile bringt, da dadurch eine Mazeration der Wundumgebung durch Wundflüssigkeit deutlich eingeschränkt werden kann.

Die wachsende Bedeutung von CMC resultiert aus der Tatsache, dass dieses Polymer biokompatibel, nicht toxisch und biologisch abbaubar ist, wobei diese positiven Eigenschaften bis zu einem Grenz-DS von etwa 1,5 nachgewiesen wurden. Allerdings zeigen auch hier aktuelle Untersuchungen zur enzymatischen Abbaubarkeit, dass die einfache Korrelation der Eigenschaften mit dem DS-Wert nicht ausreicht (Puls et al., 1997; Puls und Heinze, 1997).



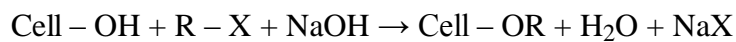
Tab. 1: Anwendungsgebiete der Natrium-Carboxymethylcellulose (nach Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie)

Einsatzgebiet	Wirkung					
	Verdickung (rheologisch)	Wasser- bindung	Gelieren	Binde- vermö- gen	Suspendie- ren	Adsorption
<b>Waschmittel</b>						
Waschpulver					x	x
Seife					x	x
Weichspüler						x
<b>Kosmetik</b>						
Zahnpasta		x			x	
Hautcreme	x	x				
Shampoo	x				x	
<b>Pharmazie</b>						
Tablettensprengmittel	x			x		
Salben	x	x				
<b>Nahrungsmittel</b>						
Backwaren	x		x		x	
Kartoffelprodukte	x		x			
Mayonnaisen, Saucen	x	x				
Fruchtsaft	x					
Wein						x
Eiscreme	x	x				
<b>Landwirtschaft</b>						
Pflanzenschutz	x	x			x	x
Samen-Compound				x	x	
<b>Bohrindustrie</b>						
Bohrspülung		x				
Brunnenbau		x				
<b>Papierindustrie</b>						
Holzfaserplatten				x	x	
Oberflächenpräparation				x		
<b>Anstrichstoffe</b>						
Leimfarbe	x	x		x	x	
Dispersionsfarbe	x	x		x	x	
Blei-/Farbstifte				x	x	
<b>Klebstoffe</b>						
Tapetenkleber	x	x				

CMC wurde in Deutschland bereits kurz nach dem 1. Weltkrieg als Substitut für Gelantine entwickelt (Ohne Autor, 1918). Die technische Produktion erfolgte aufgrund der hohen Investitionskosten erst ab etwa 1935 und ist vor allem auf die Entdeckung zurückzuführen, dass CMC die Wirksamkeit von synthetischen Detergenzien beträchtlich verbessert.

Unabhängig von den verschiedenen technischen Ausführungen der Hersteller blieb der grundlegende chemische Prozess von 1918 unverändert. Die Cellulose wird in wässriger Natronlauge gequollen und die sich dabei bildende Alkalicellulose mit dem Natriumsalz der Monochloressigsäure oder der Säure, die im stark alkalischen System naturgemäß neutralisiert wird, umgesetzt. Neben dem Hauptprodukt CMC entstehen Natriumchlorid und, aufgrund der Hydrolyse des Veretherungsreagenzes, Salze der Glycolsäure als Nebenprodukte.

#### Williamson-Ethersynthese



R = Alkyl, Aralkyl, funktionalisiertes Alkyl

X = Halogen

### 3. ZIELE DER ARBEIT

In der vorliegenden Dissertation wird das Biomaterial Carboxymethylcellulose untersucht, welches zum Beispiel in der Wundbehandlung Anwendung findet. Carboxymethylcellulose ist biokompatibel, biologisch abbaubar und als adjuvanter quellfähiger Bestandteil bereits in diversen Hydrokolloid-Verbänden (z. B. Aquacel<sup>®</sup>, Fa. ConvaTec Ltd.) erprobt. Diese Wundverbände werden vor allem bei der Therapie moderat bis stark exsudierender Wunden eingesetzt und zeichnen sich durch eine relativ hohe Sicherheit, Effektivität und gute Toleranz durch die Patienten aus. Aufgrund ihrer physiko- chemischen Eigenschaften hat Carboxymethylcellulose die Fähigkeit, Flüssigkeit durch Gelbildung zu immobilisieren. Bei Kontakt mit Wundsekret wandelt sie sich in ein weiches Gel und schafft ein für die Wundheilung ideales feuchtes Milieu. Carboxymethylcellulosen besitzen eine sehr hohe Absorptionskapazität, diese Eigenschaft vermindert den Flüssigkeitsaustritt an den Wundrändern, so dass eine Mazeration der Wundumgebung durch Wundflüssigkeit deutlich eingeschränkt werden kann.

Ziel der Arbeit ist es, zu untersuchen, ob und unter welchen Bedingungen Carboxymethylcellulose auch **bioaktiv** auf humane Keratinozyten wirken kann. Zu diesem Zweck werden fünf Carboxymethylcellulosen mit unterschiedlichem Substitutionsgrad ausgewählt. Folgende Fragen sollen in den Untersuchungen beantwortet werden:

- Ist die Proliferation der Keratinozyten vom Substitutionsgrad der verwendeten CMC abhängig?
- Ist die Proliferation der Keratinozyten von der jeweiligen Konzentration der CMC abhängig?
- Inwieweit spielt die Inkubationsdauer der Zellen mit CMC für die Proliferation eine Rolle?
- Welche Interleukine werden in welchen Konzentrationen und zu welchem Zeitpunkt während der Inkubation mit Carboxymethylcellulose von den Keratinozyten freigesetzt?
- Wirken die untersuchten Carboxymethylcellulosen zytotoxisch auf die Keratinozyten bzw. gibt es Hinweise auf Apoptosevorgänge?
- Welchen Einfluss hat die Inkubation der Keratinozyten mit CMC auf die Bildung freier Sauerstoffradikale?

## **4. MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 HaCaT-Zellen**

#### **4.1.1 Herkunft und Lagerung**

Die Untersuchungen wurden an der spontan immortalen humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT (40. bis 55. Passage) durchgeführt. Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. N. E. Fusenig vom Deutschen Krebsforschungsinstitut in Heidelberg zur Verfügung gestellt.

HaCaT-Zellen sind transformierte epitheliale Zellen, die von der peripheren Normalhaut des OP-Präparates eines mit Sicherheitsabstand exzidierten Melanoms (Rücken, 62 Jahre, männlich) entnommen wurden und nach Transplantation auf Nacktmäuse ein geordnet stratifiziertes und differenziertes Epithel ohne Tumorigenität zeigen. In vitro wachsen sie sowohl auf Agar als auch auf Plastik.

HaCaT-Zellen haben die Fähigkeit, ein ungewöhnlich breites Spektrum an Keratinen zu exprimieren, wobei allerdings die jeweiligen Umgebungsbedingungen eine wichtige Rolle spielen. Neben der Ausschüttung der Keratine K6, K7, K8, K14, K16, K17, K18, K19 und weiterer Marker, wie Involucrin und Filaggrin (Ryle et al., 1989), lassen sich darüber hinaus auch die beiden für die Zelldifferenzierung spezifischen epidermal suprabasalen Keratine K1 und K10 nachweisen (Boukamp et al., 1988).

Die Lagerung der Zellen erfolgte in sterilen Kryoröhrchen (Fa. Greiner) mit jeweils 2 Millionen Zellen in Einfriermedium (DMSO) Inhalt. Diese wurden mit dem Planer Biomed (Kryo 10, Serie II) der Fa. Messer Griesheim bei  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren. In mit flüssigem Stickstoff gefüllten Gefäßen erfolgte danach die Lagerung.

#### **4.1.2 Kultivierung und Vermehrung**

Es wurden jeweils ca. 1 Million HaCaT-Zellen in Zellkulturflaschen der Fa. Greiner (Fläche  $75\text{ cm}^2$ ) eingesät und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 6 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank kultiviert.

Als Zellkulturmedium verwendeten wir Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) der Fa. Biochrom, welches zusätzlich mit hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS),

Penicillin-Streptomycin-Fungicin (PSF) und L-Glutamin versetzt wurde. 500 ml Medium fügten wir 50 ml FKS, 5 ml PSF und 10 ml 200 M L-Glutamin zu.

Ein Wechsel des Mediums erfolgte jeweils am 3. Tag, die Ernte aus Kulturflaschen mit einem konfluenten Zellrasen und die Einsaat einer neuen Zellpassage am 10. Tag nach Einsaat.

Dazu wurde zu Beginn das Medium abgesaugt, danach mit PBS Dulbecco's-Puffer (Fa. GIBCO BRL) gespült, um alle noch verbliebenen Mediumreste zu entfernen und darauf PBS-EDTA-Puffer (EDTA der Fa. Sigma) in die Zellzuchtflasche gegeben. Durch die Zugabe von PBS-EDTA erreicht man bereits eine Auflockerung der Verbindungen zwischen den einzelnen Zellwänden. Nach anschließenden 15 min Inkubation im Brutschrank wurde PBS-EDTA wieder abpipettiert und eine definierte Menge 0,25%iges Trypsin (Fa. Sigma) zugegeben. Nach ca. 10 bis maximal 15 min Inkubation im Brutschrank lösten sich die einzelnen HaCaT-Zellen vollständig vom Boden der Kulturflasche. Nach sorgfältiger Durchmischung der Suspension wurde diese in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben und die Trypsinierung mit einer definierten Menge DMEM (DMEM + FKS, + PSF, + L-Glutamin) gestoppt. Danach erfolgte für 10 min bei 1000 U/ min eine Zentrifugation.

Im Anschluss wurde der Überstand dekantiert, das Pellet aufgemischt und eine definierte Menge Medium (8 ml bei 10 Tagen Bebrütung) zugegeben.

Nachdem wir eine kleine Menge dieser Suspension zur Zellzahlbestimmung entnommen hatten, wurde die Zellzahl durch Supplementierung mit frischem Medium auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml Medium eingestellt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem CASY 1 (Fa. Schärffesystem GmbH, Germany).

Die HaCaT-Zellen wurden jeweils in Mikrotiterplatten „Cellstar®“ à 96 Well der Fa. Greiner gezüchtet, wobei die eingesäte Zellkonzentration der Norm 20 000 - 40 000/ cm<sup>2</sup> entsprach. Das Einsaatvolumen in die bei den Versuchen verwendeten Mikrotiterplatten betrug 200 µl Zellsuspension pro Well.

Für die Versuche mit Carboxymethylcellulose verwendeten wir serumfreies Keratinozytenmedium (Defined Keratinocyte-SFM) der Fa. GIBCO BRL, um einen möglichen Einfluss von im DMEM beinhalteten Substanzen, insbesondere des FKS, auf die Untersuchungen auszuschließen. Dazu wurde beim ersten Mediumwechsel am 3. Tag nach Einsaat komplettes Medium (in 500 ml DMEM 50 ml FKS + PSF + L-Glutamin) und beim zweiten Mediumwechsel am 6. Tag nach Einsaat Medium mit einer geringeren Konzentration an FKS (in 500 ml DMEM 2,5 ml FKS + PSF + L-Glutamin) verwendet, um die HaCaT-Zellen langsam an ein serumfreies Medium zu gewöhnen.

### **4.1.3 Vitalitätsbestimmung von HaCaT-Zellen**

Die Bestimmung der Vitalität der HaCaT-Zellen nach dem Abtrypsinieren, Zentrifugieren und Vereinzeln erfolgte mit dem Trypanblau-Ausschlusstest (Sandström, 1965). Dabei wurden jeweils gleiche Volumina an Zellsuspension und Trypanblau-Lösung gemischt, ein Tropfen dieser Lösung in eine Neubauer-Zählkammer übertragen und im Anschluss daran die Anzahl der vitalen (Trypanblau-ausschließende) und toten (mit Trypanblau angefärbte) Zellen unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung bestimmt.

Die Vitalität konnte so mit folgender Formel berechnet werden:

Vitalität (%) = ungefärbte Zellen /  $\Sigma$  aller Zellen x 100.

### **4.1.4 Lagerung der Zellkulturüberstände**

Für die Bestimmung der nachfolgenden Parameter wurden die Zellkulturüberstände aus den Mikrotiterplatten in Teströhrchen portioniert und bei -80 °C gelagert.

## **4.2 Proliferation der HaCaT-Zellen – Quantitative Analyse**

### **4.2.1 Fluoreszenzmessung**

Das Proliferationsverhalten der HaCaT-Zellen wurde mit Hilfe des Fluoreszenz-Messsystems CytoFluor 2300 der Fa. Millipore unter Verwendung des Farbstoffs 33342 der Fa. Hoechst beurteilt, wobei hier die Vorteile einer vollautomatischen Messung der subkonfluenten Zellen in den Mikrotiterplatten mit einer anschließenden Datenanalyse verbunden werden.

### **4.2.2 Vorbereitung und Durchführung der Messung**

Für die Untersuchung wurden ca. 15 000 Zellen/ Well in DMEM mit geringer FKS-Konzentration (in 500 ml DMEM 2,5 ml FKS) in Mikrotiterplatten eingesät und 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurde der Überstand an DMEM aus den 96 Wells der Mikrotiterplatten abpipettiert und die 5 verschiedenen, in SFM gelösten, Carboxymethylcellulosen jeweils in den 6 beschriebenen Konzentrationen aufgebracht.

Parallel dazu wurden jeweils ein Platten-Leerwert sowie 7 Kontrollen mit SFM pur mitgeführt.

Der Überstand an wirkstoffhaltigem Medium in den 96 Wells der Mikrotiterplatte wurde abpipettiert, für weitere Untersuchungen in Teströhrchen gefüllt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Danach erfolgte eine zweimalige Spülung der Mikrotiterplatte mit PBS-Puffer.

Der Farbstoff 33342 der Fa. Hoechst, welcher den Zellkern lebender Zellen anfärbt, wurde in PBS-Puffer gelöst (5 mg/ 10 ml). Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet selektiv an A-T-Basenpaare mit einer Linearität zwischen  $5 \times 10^3$  und  $5 \times 10^5$  Zellen/ Well.

Es wurden nun jeweils 100  $\mu\text{l}$  der gewonnenen Farbstoffstammlösung in die Wells pipettiert und die Mikrotiterplatte 30 min im Brutschrank bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 6 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Danach erfolgte die Messung mit dem CytoFluor 2300 (Fluoreszenzwellenlängen: Extinktion 360 nm, Emission 460 nm).

### **4.3 Messung von Interleukinen im Zellkulturüberstand**

Die Überstände der Zellkulturen wurden von uns auf ihren Gehalt an verschiedenen Interleukinen überprüft.

Wir konzentrierten uns dabei auf die Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-2-Rezeptor, IL-6 und IL-8.

Die Messungen erfolgten dabei mit dem Milenia<sup>®</sup>-Enzyme-Immunoassay der Fa. DPC Biermann. Zusätzlich verwendeten wir das vollautomatischen Chemiluminiszenz-Immunoassay-System IMMULITE<sup>®</sup> der Fa. DPC Biermann.

#### **4.3.1 Messung von Interleukinen mit dem Milenia<sup>®</sup>-Enzyme-Immunoassay**

Das Milenia<sup>®</sup>-Festphasen-Enzymimmunoassay ermöglicht eine quantitative Bestimmung von Interleukinen. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir mit diesem Testbesteck Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-2R und Interleukin-6 im Zellkulturüberstand.

Für die Untersuchung waren ca. 15 000 Zellen/ Well in DMEM mit geringer FKS-Konzentration (in 500 ml DMEM 2,5 ml FKS) in Mikrotiterplatten eingesät und 24 h im Brutschrank bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 6 %  $\text{CO}_2$  inkubiert worden. Dann wurde der Überstand an DMEM aus den 96 Wells der Mikrotiterplatten abpipettiert und die in SFM gelöste Carboxymethylcellulose CMC 21903 jeweils in den 6 beschriebenen Konzentrationen aufgebracht.

Parallel dazu wurden jeweils ein Platten-Leerwert sowie 7 Kontrollen mit SFM pur mitgeführt.

Nach 24 h bzw. 48 h Inkubation der Platten bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellkulturüberstände, getrennt nach der jeweiligen CMC-Konzentration, abpipettiert und bei -80 °C eingefroren.

Direkt vor Versuchsbeginn wurden nun die bei den vorangegangenen Proliferationsbestimmungen gewonnenen und bei -80 °C eingefrorenen Zellkulturüberstände für die quantitative IL-1 $\beta$ -, IL-2R- und IL-6-Messung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt. Es wurden erneut die Zellkulturüberstände der bereits beschriebenen CMC-Konzentrationen (0,50 %, 1,00 %, 2,50 %, 5,00 %, 7,00 %, 10,00 %) verwendet.

#### **4.3.1.1 Vorbereitung der Messung**

Jeweils 100  $\mu$ l Zellkulturüberstand bzw. 100  $\mu$ l der Standards sowie 150  $\mu$ l Probenpuffer wurden in die Wells des verwendeten Assays pipettiert. Bei jeder neuen Messreihe musste mit den im Testkit enthaltenen Kalibratoren eine Standardkurve ermittelt werden.

#### **4.3.1.2 Messprinzip und Durchführung der Messung**

Dieser Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) basiert auf dem Prinzip, dass für das jeweilige Interleukin spezifische Antikörper in einem ersten Schritt an den Boden der Wells in den Mikrotiterplatten chemisch fest gebunden werden. Danach werden die zu untersuchenden Standards und Zellkulturüberstände in die Wells pipettiert. Ist das entsprechende Interleukin in der Probenlösung vorhanden, lagert es sich an seinen spezifischen Antikörper an. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, gegen den ersten Antikörper gerichteter enzymmarkierter Antikörper zugegeben. Es entsteht ein sogenannter Sandwichkomplex, bestehend aus dem ersten Antikörper, dem Interleukin-Molekül und dem enzymmarkierten Antikörper. Danach wird überschüssiger enzymmarkierter Antikörper durch Waschen entfernt.

Zugegebenes Substrat, 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB), wird anschließend vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt (blau) umgesetzt. Die Enzymreaktion wird nach 30 Minuten durch Zugabe von Salzsäure beendet (Farbumschlag von blau zu gelb). Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung ist der Konzentration des Interleukins in den Standards bzw. den Proben direkt proportional.



Die genannten vier Reaktionsschritte sind jeweils durch Waschschr tte, bei denen überschüssige Reaktionspartner wieder entfernt werden, getrennt.

Aus den Schnittpunkten der gemessenen Absorptionswerte der zu untersuchenden Proben mit einer Standardkurve können auf der Abszisse die entsprechenden Interleukin-Konzentrationen abgelesen werden. Diese Auswertung erfolgt automatisch mittels einer speziellen Software.

#### **4.3.2 Messung von Interleukinen mit dem IMMULITE<sup>®</sup>-System**

Es handelt sich hierbei um ein Festphasen-Chemiluminiszenz-Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Interleukinen.

In den IMMULITE<sup>®</sup>-Teströhrchen, in denen sowohl die Inkubation als auch die Signalentwicklung stattfinden, befindet sich eine kleine Kugel, die mit dem für das zu messende Interleukin spezifischen Antikörper beschichtet ist.

Unter Zuhilfenahme eines außerordentlich sensitiven Chemiluminiszenz-Substrates, dem Adamantyldioxetanphenylphosphat, wird die Menge der gebundenen Enzymmarkierung bestimmt. Durch enzymkatalysierte Hydrolyse wird fortlaufend ein instabiles Adamantyldioxetanphenyl-Anion gebildet, dessen Zerfall zu einer Lichtemission f hrt.

Mit dieser Methode bestimmten wir die Interleukine IL-1 , IL-2R, IL-6 und IL-8.

##### **4.3.2.1 Vorbereitung der Messung**

Die Aliquots der eingefrorenen Kulturüberstände wurden für den Test langsam auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig durchmischt.

Bei jeder neuen Messreihe musste mit den im Testkit enthaltenen Kalibratoren eine Anpassung der Standardkurve durchgeführt werden.

##### **4.3.2.2 Durchführung des Assays**

Das Reagenzmodul wird in das Reagenzienkarussell gestellt, welches daraufhin in das Gerät eingesetzt wird. Nachdem die barkodierten Reagenziendaten eingelesen wurden, werden die Kulturüberstände in die Probenröhrchen überführt und die Probenträger mit den Röhrchen in die Ladestation gestellt. Dann erfolgt die vollautomatische Messung.

## **4.4 Bestimmung von NMP 41**

Der Matri-Tect™ NMP 41™ Cell Death Test Kit ist ein enzymatischer Immunoassay, welcher quantitativ das Kernmatrixprotein 41 bestimmt, dass von toten oder sterbenden Zellen freigesetzt wird und so Aussagen über Zytotoxizität und Apoptosevorgänge ermöglicht.

### **4.4.1 Vorbereitung der Messung**

Um das Kernmatrixprotein NMP 41 bestimmen zu können, wurden ca. 15 000 HaCaT-Zellen/ Well in DMEM mit geringer FKS-Konzentration (in 500 ml DMEM 2,5 ml FKS) in Mikrotiterplatten eingesät und 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurde der Überstand an DMEM aus den 96 Wells der Mikrotiterplatten abpipettiert und die in SFM gelöste Carboxymethylcellulose CMC 21903 jeweils in den 6 bereits beschriebenen Konzentrationen aufgebracht.

Parallel dazu wurden jeweils ein Platten-Leerwert sowie 7 Kontrollen mit SFM pur mitgeführt. Nach 24 h bzw. 48 h Inkubation der Platten bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellkulturüberstände, getrennt nach der jeweiligen CMC-Konzentration, abpipettiert.

Vor Versuchsbeginn wurden nun die bei den vorangegangenen Proliferationsbestimmungen gewonnenen Zellkulturüberstände für die quantitative Messung des Kernmatrixproteins NMP 41 vorsichtig durchmischt. Es wurden die Zellkulturüberstände der bereits beschriebenen CMC-Konzentrationen (0,50 %, 1,00 %, 2,50 %, 5,00 %, 7,00 %, 10,00 %) verwendet.

### **4.4.2 Durchführung der Messung**

In die Wells einer Mikrotiterplatte wird ein Capture-Antikörper für NMP 41 gegeben, welcher sich nach 1 Stunde Inkubation an die Well-Oberflächen bindet. Nach einem Waschvorgang, welcher überschüssiges Material wieder entfernt, werden die Standards und die zu untersuchenden Zellkulturüberstände in die Mikrotiterplatte pipettiert. Während einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur bindet sich das in den Kulturüberständen enthaltene NMP 41 an den Capture-Antikörper, danach wird erneut gewaschen und Dig-

oxigenin-anti-NMP 41-Antikörper zugegeben. Darauf folgt eine Stunde Inkubation, in der dieser Antikörper an das bereits gebundene NMP 41 andockt, bevor durch einen Waschvorgang nicht gebundener Antikörper wieder entfernt wird.

Nach Zugabe von HRP-gebundener-Schaf-Digoxigenin-Antikörperlösung und einer weiteren Stunde Inkubation wird gewaschen und eine O-Phenyl-diamin-Farbstofflösung (OPD) in die Wells pipettiert, welche dort 20 min verbleibt. Mit einer Stopplösung wird der Farbumschlag beendet, und es kann bei einer Wellenlänge von 490 nm die Menge an NMP 41 quantitativ bestimmt werden.

#### **4.5 Messung von Freien Sauerstoffradikalen (ROS)**

Die Umwandlung von nicht- fluoreszierendem 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) in die fluoreszierende Verbindung 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) kann als ein Monitor für die Produktion von ROS (Reactive Oxygen Species) in Zellen genutzt werden (Keston et al., 1965; Cathcart et al., 1983).

Die Bildung freier Sauerstoffradikale wurde in der vorliegenden Arbeit durch Anwendung der Fluoreszenzmethode evaluiert (LeBel et al., 1992; Hipler et al., 2001).

Wir verwendeten 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA), um die Menge des von den HaCaT-Zellen gebildeten  $H_2O_2$  quantitativ zu bestimmen.

Das nicht- fluoreszierende 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) wird von einem Hydroperoxid, z. B.  $H_2O_2$ , in Anwesenheit einer Peroxidase in mehreren Schritten in die fluoreszierende Verbindung 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) umgewandelt (Goldman et al., 1998).

DCFH-DA wird dazu durch die Zellmembran hindurch transportiert und durch Esterasen in das nicht- fluoreszierende 2',7'-Dichlorofluorescein (DCFH) deacetyliert. Die gebildete Verbindung bleibt im Zellinneren eingeschlossen. Durch die Einwirkung von Peroxiden ( $H_2O_2$ ) wird DCFH in DCF umgewandelt.

Mit dem Fluorometer FLUOstar (Fa. BMG Labtechnologies, Germany) erfolgt die quantitative Messung von DCF, welche Rückschluss auf die Menge der gebildeten ROS erlaubt.

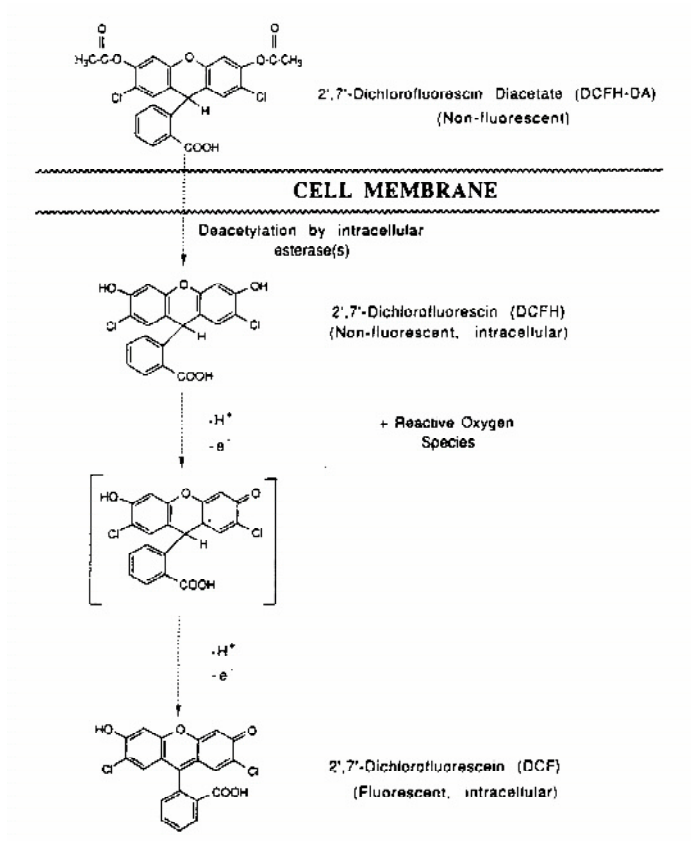


Abb. 1: Flussschema zur Umwandlung von nicht- fluoreszierendem DCFH-DA in fluoreszierendes DCF durch ROS, nach LeBel et al. (1992)

#### 4.5.1 Vorbereitung der Messung

Es wurden, wie schon in den vorangegangenen Versuchen, ca. 15 000 HaCaT-Zellen/ Well in DMEM mit geringer FKS-Konzentration (in 500 ml DMEM 2,5 ml FKS) in Mikrotiterplatten eingesät und inkubiert. Dann wurde der Überstand an DMEM in den 96 Wells der Mikrotiterplatten abpipettiert und die in SFM gelöste Carboxymethylcellulose CMC 21903 jeweils in den 6 bereits beschriebenen Konzentrationen aufgebracht.

Parallel dazu wurden jeweils ein Platten-Leerwert sowie 7 Kontrollen mit SFM pur mitgeführt.

Nach 24 h bzw. 48 h Inkubation der Platten bei 37 °C und 6 %  $\text{CO}_2$  wurde die Anzahl der HaCaT-Zellen in den Wells der Mikrotiterplatten mit Hilfe des Fluoreszenz-Messsystems CytoFluor 2300 der Fa. Millipore unter Verwendung des Farbstoffs 33342 der Fa. Hoechst beurteilt (Fluoreszenzwellenlängen: Excitation 360 nm, Emission 460 nm), um später Aussagen über das Verhältnis zwischen der Zellzahl und der Menge an produzierten ROS treffen zu können.

2',7'-DCFH-DA wurde in Ethanol gelöst, vor der Messung mit NaOH und PBS versetzt und der pH- Wert der Lösung auf 7,4 eingestellt. Zur Erstellung einer Standardkurve verwendeten wir 2',7'-Dichlorofluorescein.

Nach Zugabe von 100 µl 2',7'-DCFH-DA in die Wells der Mikrotiterplatten wählten wir verschiedene Inkubationszeiten (Versuchsansatz 1 mit 24 h CMC-Inkub.: 60 min, 75 min, 120 min, 165 min, 225 min; Versuchsansatz 2 mit 48 h CMC-Inkub.: 60 min, 90 min, 12 h, 14 h), nach deren Ablauf dann DCF quantitativ bestimmt werden konnte. Der Gehalt an DCF korreliert mit der Menge an gebildeten ROS.

Jede Messung wurde mindestens 16 mal doppelt durchgeführt.

#### 4.5.2 Durchführung der Messung

Zu den HaCaT-Zellen in den Wells der Mikrotiterplatten werden jeweils 100 µl 2',7'-DCFH-DA (0,4 nM/ ml) pro Well gegeben. Die darauf folgende Inkubationszeit bei 37 °C wird zeitlich variiert. Danach werden die Mikrotiterplatten für mindestens 3 Minuten auf Eis gelegt, bevor die Fluoreszenzmessung (Extinktion 485 nm, Emission 538 nm) mit dem Fluorometer FLUOstar (Fa. BMG Labtechnologies, Offenburg) erfolgen kann.

### 4.6 Untersuchte Carboxymethylcellulosen

Bei den vorliegenden Untersuchungen konzentrierten wir uns auf den Einfluss verschiedener Carboxymethylcellulosen auf humane Keratinozyten. Die untersuchten Substanzen wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Th. Heinze vom Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der FSU Jena zur Verfügung gestellt.

**CMC 21903** ist ein technisches Muster der Fa. Fluka mit einem DS = 0,70 und mittelviskoser wässriger Lösung.

**CMC 21901**, ein weiteres technisches Muster der Fa. Fluka mit einem DS = 0,92.

**CMC aus FiSi**, welches ein am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der FSU Jena hergestelltes Labormuster ist, hat als Ausgangsmaterial Fichtensul-

fitzellstoff. Durch ein Holzaufschlussverfahren und anschließende Bleichung werden Xylane und das Lignin abgetrennt. Der Substitutionsgrad beträgt  $DS = 0,85$ .

**CMC 85B/31** ist ebenfalls ein Labormuster vom Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie und durch eine nochmalige Carboxymethylierung der bereits genannten CMC aus FiSi entstanden. Der Substitutionsgrad beträgt  $DS = 1,70$ .

**CMC 85B/31'**, auch ein Labormuster vom Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, ist die erneut carboxymethylierte Form der CMC 85B/31. Der Substitutionsgrad beträgt  $DS = 2,26$ .

#### **4.7. Statistik**

Die statistische Auswertung der vorliegenden Arbeit erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 9,0 für Windows.

Normalverteilungstests nach Kolmogorow-Smirnov (korrigiert nach Lillefors) wurden aufgrund der geringen Fallzahlen (unter 25) durch den Test nach Shapiro-Wilk untermauert. Da sich dabei zum Teil nicht normal verteilte Daten fanden, wurden einheitlich nichtparametrische Testverfahren angewendet.

Aufgrund der vorliegenden Datenverteilung wurde zur Kennzeichnung der Varianz der Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die ermittelten Werte in prozentuale Verhältnisse gesetzt.

Gruppenvergleiche wurden mit dem Test nach Mann-Whitney durchgeführt. Alle  $p < 0,05$  zeigen eine signifikante Differenz der Mittelwerte an.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Eichkurve zur Berechnung der Zellzahl

Mit Hilfe des Gerätes CASY 1 (Fa. Schärferesystem GmbH, Germany) wurden verschiedene definierte HaCaT-Zellzahlen in DMEM eingestellt. Diese wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten der Fa. Greiner eingesät.

Nach einer Anheftungszeit von 12 Stunden wurde das Proliferationsverhalten der HaCaT-Zellen mit Hilfe des Fluoreszenz-Messsystems CytoFluor 2300 (Fa. Millipore) unter Verwendung des Farbstoffs 33342 der Fa. Hoechst beurteilt. Aus den gemessenen Absolute Fluorescence Units (AFU) resultierte eine lineare Funktion der Grundgleichung  $f(x) = mx + n$  (Abb. 2). Die sich daraus ergebende Geradengleichung für den entstandenen Graphen wurde ermittelt, so dass Berechnungen der Zellzahl anhand der gemessenen AFU möglich werden. Der Anstieg der Geraden  $m$  beträgt 0,0321 und die Verschiebung  $n$  auf der y-Achse 1031,2.

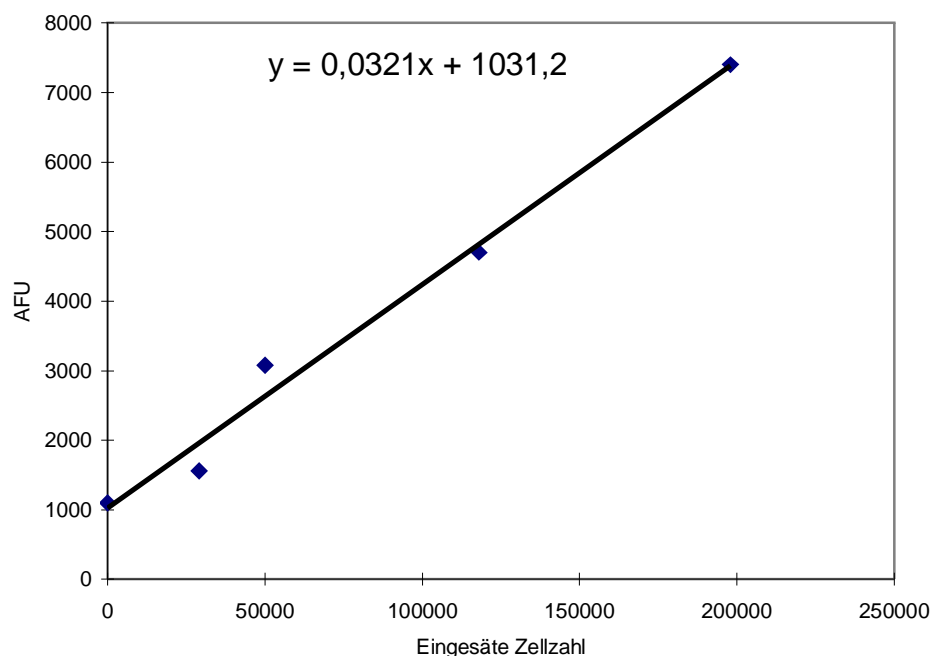


Abb. 2: Eichkurve zur Berechnung der Zellzahl aus den ermittelten AFU, Messung der AFU 12 h nach Einsaat der HaCaT-Zellen in die Mikrotiterplatten; Geradengleichung für die lineare Funktion  $f(x) = 0,0321x + 1031,2$ .

## 5.2 Wachstumsverhalten von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit

HaCaT-Zellen wurden in DMEM in Mikrotiterplatten eingesät (5000 Zellen/ Well) und deren Proliferation nach festgesetzten Inkubationszeiten mit Hilfe des beschriebenen Fluoreszenz-Messsystems CytoFluor 2300 der Fa. Millipore unter Verwendung des Farbstoffs 33342 der Fa. Hoechst gemessen. Anhand der Abb. 3 wird deutlich, dass innerhalb des Zeitraumes von 120 h ein stetiger Proliferationsanstieg zu verzeichnen war. In diesem Zeitbereich siedelten wir unsere weiteren Messungen an.

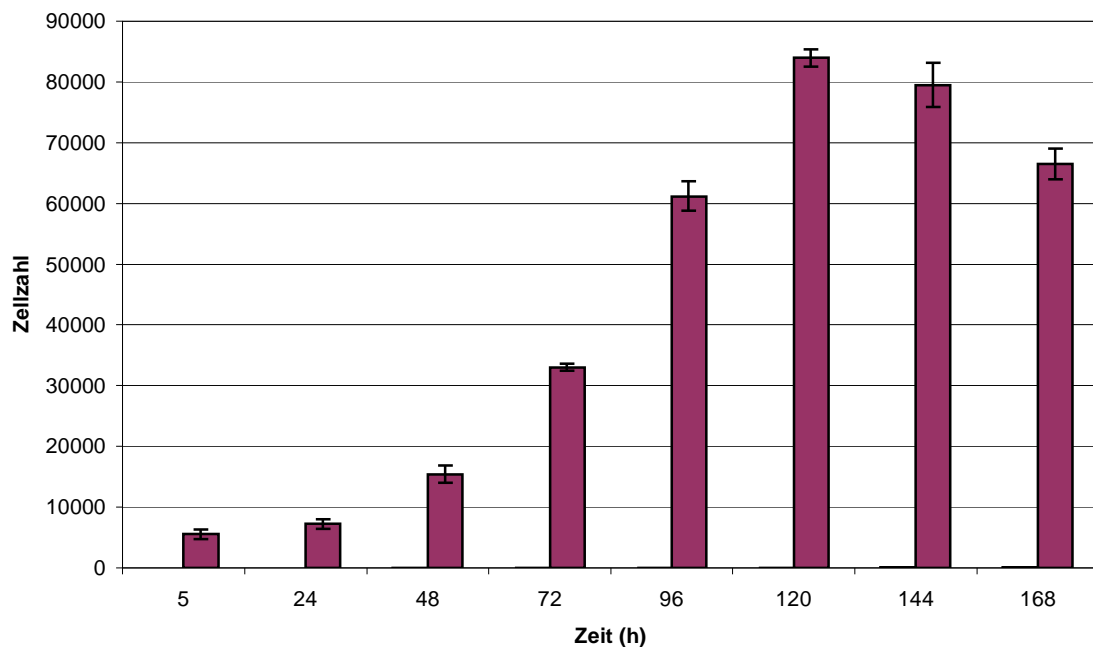


Abb. 3: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit (Mittelwerte der Zellzahl und Standardfehler der Mittelwerte).



### **5.3 Bestimmung der für die Untersuchungen günstigen CMC-Konzentrationen und Versuchsdauer**

Es wurde die Carboxymethylcellulose 21903 mit einem DS von 0,70 ausgewählt und durch Auflösen dieser Substanz in SFM eine Verdünnungsreihe erstellt (CMC-Konzentrationen zwischen 0,50 % - 10,0 % entsprechen 0,005 mg/ ml - 0,1g/ ml). Wir stellten so die CMC-Konzentrationen 0,50 %, 1,0 %, 2,5 %, 5,0 %, 7,0 % und 10,0 % her.

Im Ergebnis erhielten wir unterschiedlich stark viskose Lösungen. Die Herstellung von CMC-Lösungen mit Konzentrationen  $> 0,1\text{g/ ml}$  gestaltete sich äußerst schwierig, da diese dann so viskos wurden, dass ein Pipettieren kleinster Mengen in die Mikrotiterplatten nicht mehr möglich war.

Nun wurden die HaCaT-Zellen (5000 Zellen/ Well) in DMEM mit geringer FKS-Konzentration (in 500 ml DMEM 2,5 ml FKS) in Mikrotiterplatten eingesät. Nach 24 h wurde der DMEM-Kulturüberstand verworfen und durch die bereits in SFM gelösten unterschiedlichen CMC-Konzentrationen ersetzt.

Die resultierende Proliferationsmessung der HaCaT-Zellen erfolgte jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h mit Hilfe des beschriebenen Fluoreszenz-Messsystems CytoFluor 2300 der Fa. Millipore unter Verwendung des Farbstoffs 33342 der Fa. Hoechst.

Deutliche Proliferationssteigerungen fanden sich nach 24 h bzw. 48 h Inkubation mit CMC 21903. Nach 72 h war im Vergleich zu Tag 1 und 2 kein Proliferationsanstieg mehr zu verzeichnen (Abb. 4).

Dieses Ergebnis führen wir darauf zurück, dass zu diesem Zeitpunkt bereits die meisten der im Nährmedium enthaltenen Nährstoffe von den sich schon stark vermehrten HaCaT-Zellen verbraucht worden waren.

In den folgenden Versuchen konzentrierten wir uns deshalb auf das Verhalten der HaCaT-Zellen in den ersten 48 h nach Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen.

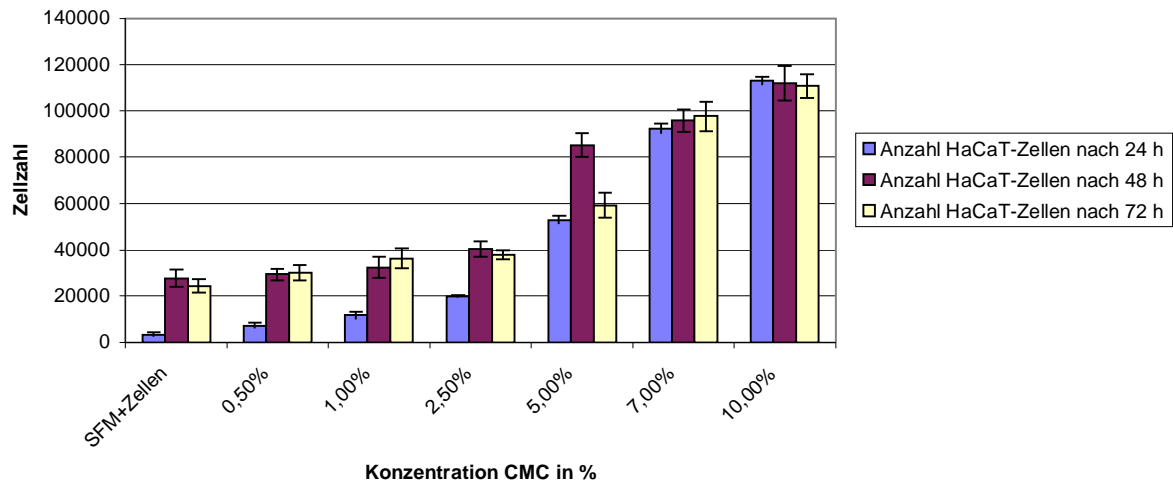


Abb. 4: Proliferation von HaCaT-Zellen nach Inkubation mit CMC 21903 über 24 h, 48 h und 72 h (Mittelwerte der Zellzahl und Standardfehler der Mittelwerte); nach 72 h Inkubation ist kein proliferationsfördernder Effekt mehr zu verzeichnen.

#### 5.4 Der Einfluss von 5 verschiedenen Carboxymethylcellulosen in unterschiedlichen Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit

Die Kinetik des Wachstums von HaCaT-Zellen bei Inkubation mit 5 verschiedenen, in jeweils gleichen Verdünnungsreihen gelösten, Carboxymethylcellulosen wurde bestimmt. Zur Untersuchung kamen die bereits eingangs charakterisierten Carboxymethylcellulosen CMC 21903, CMC 21901, CMC FiSi, CMC 85B/31 und CMC 85B/31'. Von den genannten Carboxymethylcellulosen wurden jeweils Lösungen in identischen Verdünnungsreihen (CMC-Konzentrationen von 0,50 %, 1,00 %, 2,50 %, 5,00 %, 7,00 %, 10,00 %) hergestellt. Nach 24 h bzw. 48 h Inkubation der Platten bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> mit CMC wurde das in den folgenden Diagrammen (Abb. 5 - 8) visualisierte Proliferationsverhalten der HaCaT-Zellen unter dem Einfluss der verschiedenen Carboxymethylcellulosen mittels des Fluoreszenz-Messsystems CytoFluor 2300 unter Verwendung des Farbstoffs 33342 der Fa. Hoechst deutlich.

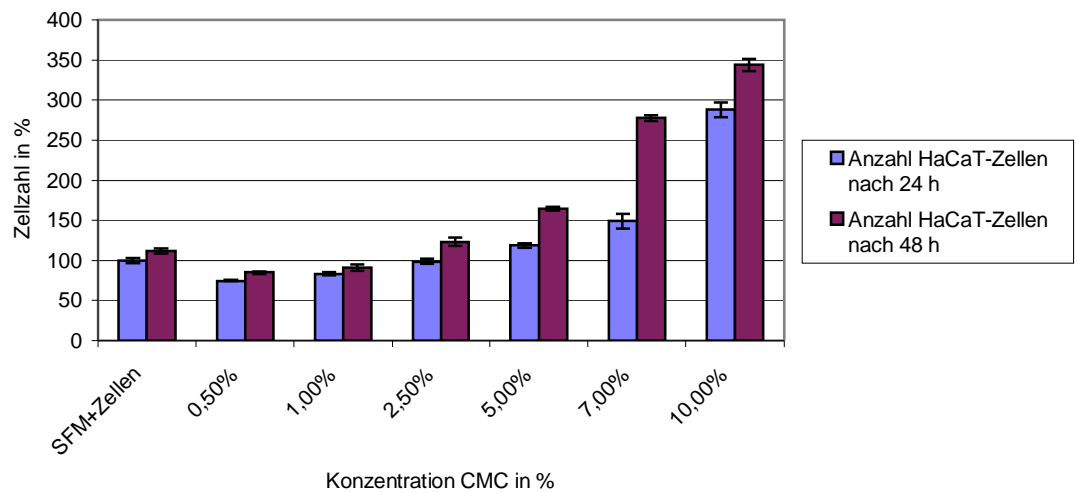


Abb. 5: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen (Mittelwerte der Zellzahl und Standardfehler der Mittelwerte in %) nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit **CMC 21903** (DS = 0,70) in SFM; signifikante Proliferationssteigerungen ( $p < 0,05$ ) nach 24 h sowie auch nach 48 h ab einer CMC-Konzentration von 5,00 %, die maximale Proliferationssteigerung nach 24 h Inkubation bei 10,00 % betrug  $288 \pm 3$  %, die maximale Proliferationssteigerung nach 48 h Inkubation bei 10,00 % betrug  $344 \pm 9$  %.

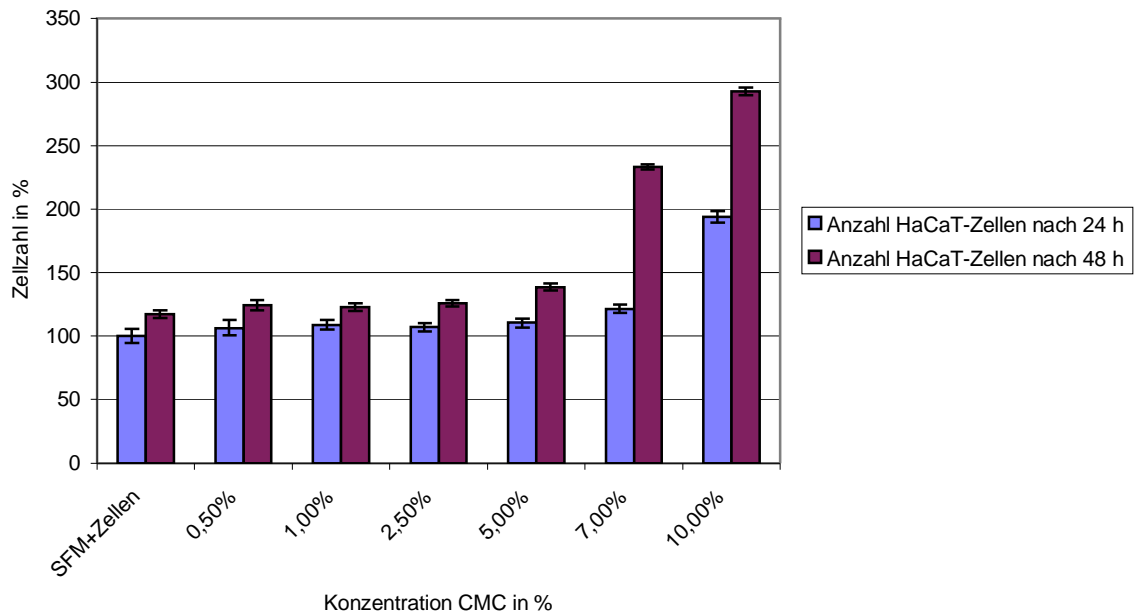


Abb. 6: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen (Mittelwerte der Zellzahl und Standardfehler der Mittelwerte in %) nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit **CMC 21901** (DS = 0,92) in SFM; signifikante Proliferationssteigerungen ( $p < 0,05$ ) nach 24 h ab einer CMC-Konzentration von 5,00 %, nach 48 h ab 0,5 %, die maximale Proliferationssteigerung nach 24 h Inkubation bei 10,00 % betrug  $194 \pm 4$  %, die maximale Proliferationssteigerung nach 48 h Inkubation bei 10,00 % betrug  $293 \pm 3$  %.

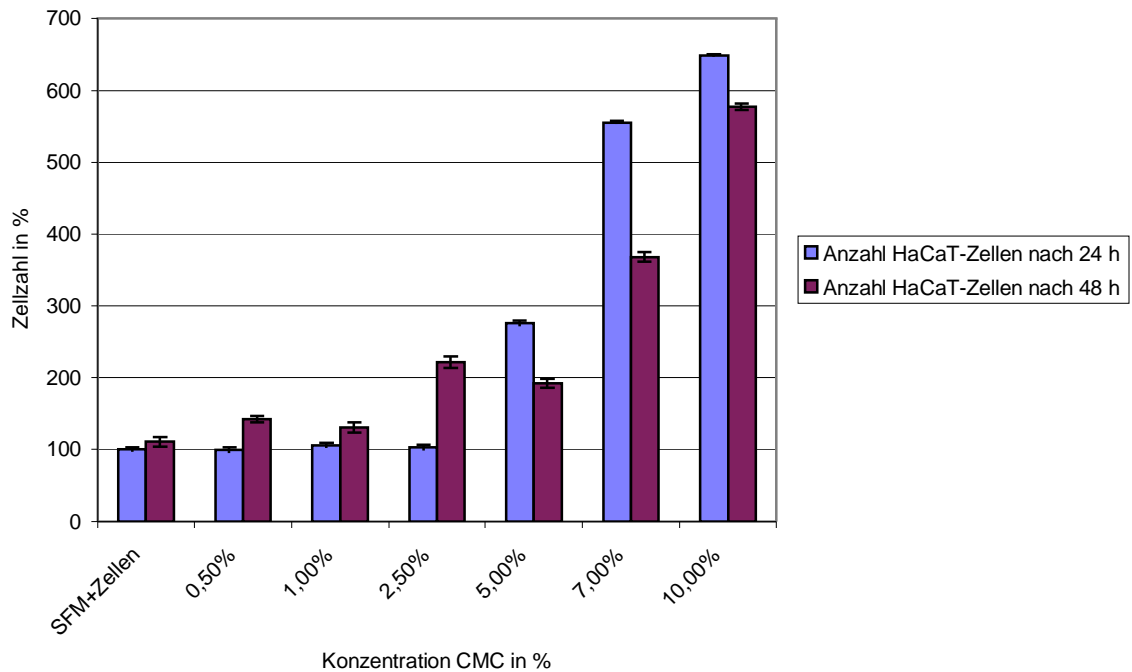


Abb. 7: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen (Mittelwerte der Zellzahl und Standardfehler der Mittelwerte in %) nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit **CMC FiSi** (DS = 0,85) in SFM; signifikante Proliferationssteigerungen ( $p < 0,05$ ) nach 24 h ab einer CMC-Konzentration von 5,00 %, nach 48 h ab 2,50 %, die maximale Proliferationssteigerung nach 24 h Inkubation bei 10,00 % betrug  $648 \pm 2$  %, die maximale Proliferationssteigerung nach 48 h Inkubation bei 10,00 % betrug  $577 \pm 2$  %.

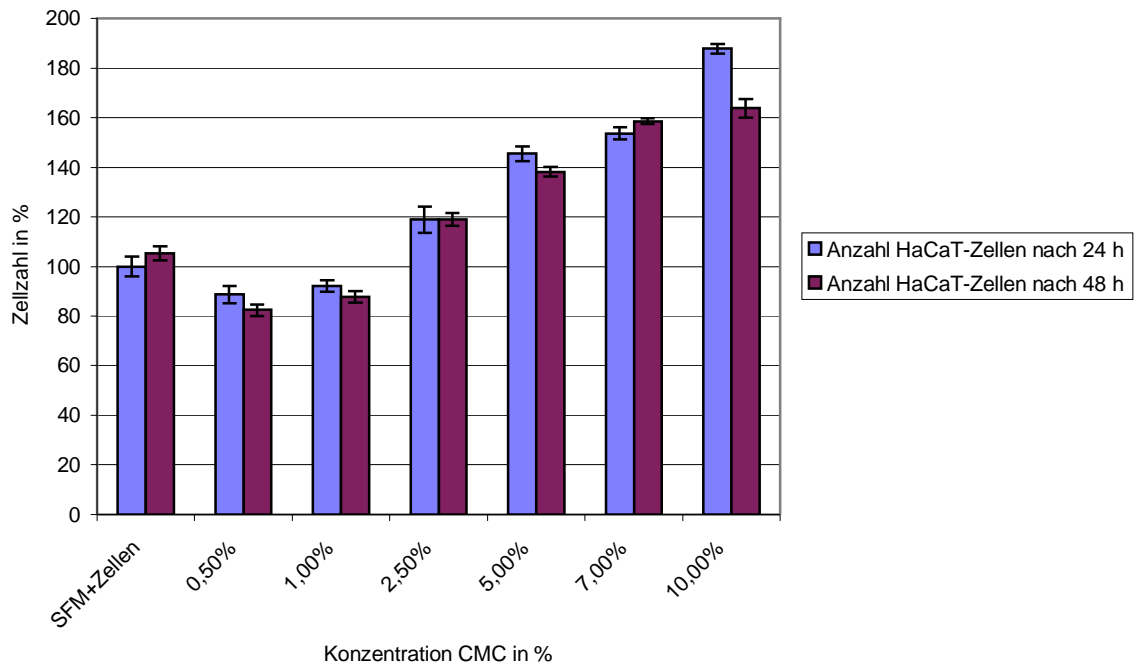


Abb. 8: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen (Mittelwerte der Zellzahl und Standardfehler der Mittelwerte in %) nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit **CMC 85B/31** (DS = 1,70) in SFM; signifikante Proliferationssteigerungen ( $p < 0,05$ ) nach 24 h ab einer CMC-Konzentration von 5,00 %, nach 48 h ebenfalls ab 5,00 %, die maximale Proliferationssteigerung nach 24 h Inkubation bei 10,00 % betrug  $188 \pm 2$  %, die maximale Proliferationssteigerung nach 48 h Inkubation bei 10,00 % betrug  $164 \pm 4$  %.

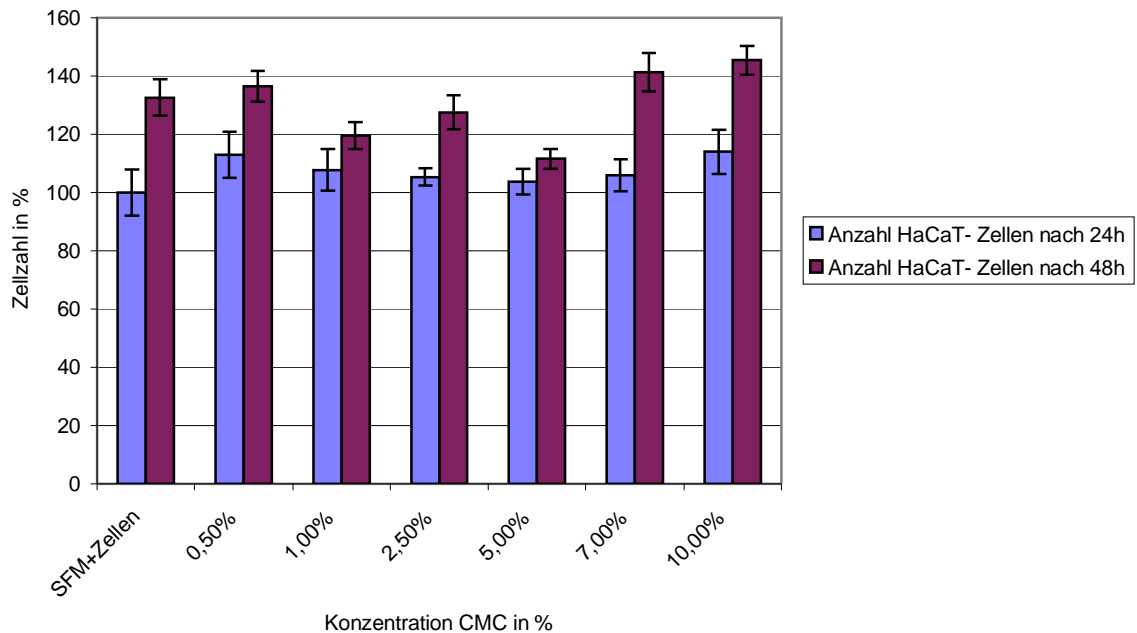


Abb. 9: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen (Mittelwerte der Zellzahl und Standardfehler der Mittelwerte in %) nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit **CMC 85B/31'** (DS = 2,26) in SFM; es ließen sich keine signifikanten Proliferationsveränderungen feststellen.

Unter den oben beschriebenen Milieubedingungen verursachten 4 der 5 untersuchten Carboxymethylcellulosen eine zeit- und konzentrationsabhängige Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen. Den deutlichsten Einfluss auf die Proliferation zeigten die CMC 21903 (DS= 0,70) nach 48 h und CMC FiSi (DS= 0,85) nach 24 h mit Wachstumssteigerungen um fast 250 % bzw. über 500 % bei CMC-Konzentrationen von 10 % im Vergleich zur Kontrolle.

Ab einer CMC-Konzentration von 5 % war der wachstumsfördernde Einfluss der **CMC 21903** sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Inkubation signifikant ( $p < 0,05$ ). Die maximale Proliferationssteigerung bei 10,00 % CMC betrug nach 24 h Inkubation  $288 \pm 3 \%$ , nach 48 h  $344 \pm 9 \%$  (Abb. 5).

Bei der Inkubation mit der **CMC 21901** zeigte sich ebenfalls nach 24 h ab einer CMC-Konzentration von 5,00 % ein signifikanter Proliferationsanstieg ( $p < 0,05$ ), nach 48 h bereits ab der 0,5%igen CMC-Lösung. Maximale Zellzahlen wurden erneut bei 10 % CMC nach 24 h ( $194 \pm 4 \%$ ) und 48 h ( $293 \pm 3 \%$ ) erreicht (Abb. 6).

Die **CMC FiSi** bewirkte den deutlichsten Proliferationsschub bei den Keratinozyten – bei Inkubation mit der 10%igen Lösung wurden nach 24h  $648 \pm 2\%$  und nach 48 h  $577 \pm 2 \%$

erreicht. Signifikante Proliferationsanstiege ( $p < 0,05$ ) waren nach 24 h bei einer CMC-Konzentration von 5 % und nach 48 h bei 2,50 % zu verzeichnen (Abb. 7).

Bei der Datenauswertung für die **CMC 85B/31** fanden wir erneut sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Inkubation ab der Verwendung der 5,00%igen CMC-Lösung Signifikanz. Die höchsten Wachstumsraten - wieder bei 10,00%iger CMC-Lösung - betrugen nach 24 h  $188 \pm 2$  % und nach 48 h  $164 \pm 4$  % und lagen damit schon deutlich niedriger als bei den bereits untersuchten Carboxymethylcellulosen (Abb. 8).

Nach 24 h und 48 h Inkubation der HaCaT-Zellen mit **CMC 85B/31'** ließen sich mit ansteigender CMC-Konzentration keine signifikanten Proliferationsveränderungen mehr nachweisen (Abb. 9).

Es zeigte sich, dass mit ansteigendem Substitutionsgrad der Carboxymethylcellulosen die Proliferationsfreudigkeit der inkubierten HaCaT-Zellen abnahm.

Waren bei der CMC FiSi (DS = 0,85) Wachstumssteigerungen um 500 % im Vergleich zur Kontrolle zu finden, waren es bei der CMC 85B/31 (DS = 1,70), der nochmals carboxymethylierten CMC FiSi, nur noch Wachstumssteigerungen um 180 % bei dem 10%igen CMC- Lösungsansatz (Abb. 8). Die CMC 85B/31', die erneut carboxymethylierte CMC 85B/31, mit dem höchsten von uns untersuchten Substitutionsgrad von 2,26, beeinflusste das Proliferationsverhalten der HaCaT-Zellen nicht mehr (Abb. 9).

## 5.5 Die Bestimmung von Interleukinen im Zellkulturüberstand

Um mehr über mögliche Ursachen des bereits untersuchten Proliferationsverhaltens der mit den verschiedenen Carboxymethylcellulosen inkubierten HaCaT-Zellen zu erfahren, begannen wir mit Messungen von Interleukinen in den Überständen der Zellkulturen. Exemplarisch wählten wir dafür aus den 5 bereits untersuchten Carboxymethylcellulosen die CMC 21903 aus.

Bei den folgenden Untersuchungen konzentrierten wir uns auf die Bestimmung der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-2R, IL-6, und IL-8, die mit Hilfe des Milenia<sup>®</sup>-Enzyme-Immunoassay bzw. dem Immulite<sup>®</sup>-System quantitativ bestimmt werden konnten.



### 5.5.1 Bestimmung von IL-1 $\beta$ im Zellkulturüberstand

Jeweils 100  $\mu$ l Zellkulturüberstand bzw. 100  $\mu$ l der Standards sowie 150  $\mu$ l Probenpuffer wurden in die Wells des verwendeten Assays pipettiert. Im Anschluss daran erfolgten die in „Material und Methoden“ beschriebenen Versuchsschritte, an deren Ende die Messung der optischen Dichten des erhaltenen Farbumschlags bei einer Wellenlänge von 450 nm stand. Diese stehen in direkter Relation zur IL-1 $\beta$ -Konzentration in den untersuchten Zellkulturüberständen.

Im Ergebnis zeigten sich messbare IL-1 $\beta$ -Expressionen erst ab einer CMC 21903-Konzentration von 5,00 %, die bei weiter ansteigender CMC-Konzentration noch zunahm. Maximale Werte wurden bei einer CMC-Konzentration von 10,00 % erreicht, nach 24 h 15,6 pg/ ml, nach 48 h 14,7 pg/ ml (Abb. 10).

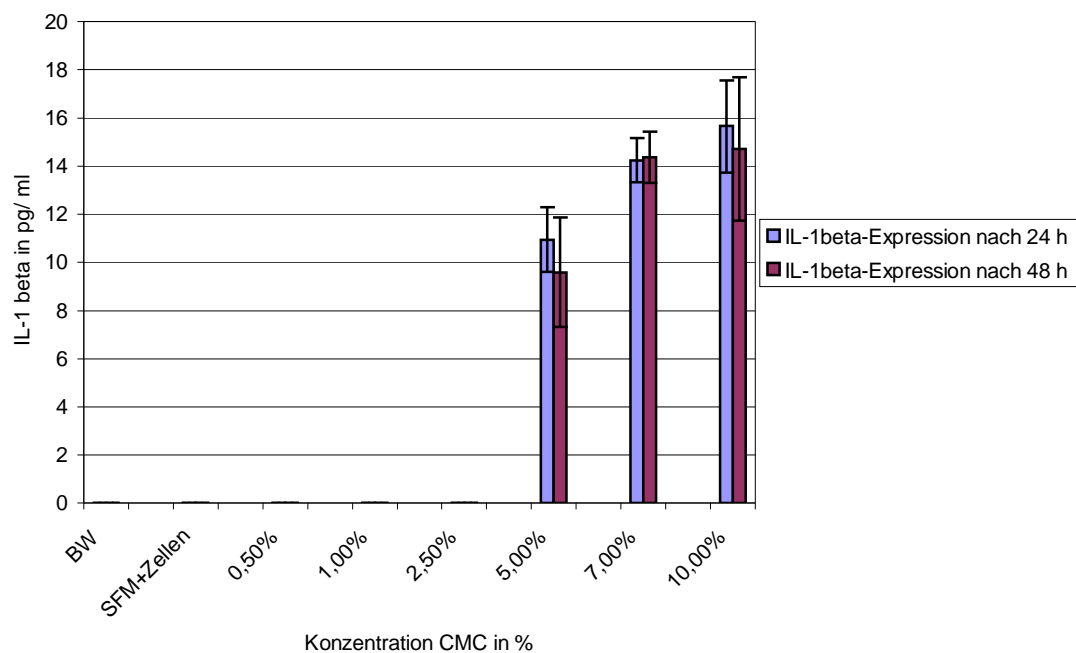


Abb. 10: Expression von **IL-1 $\beta$**  in pg/ ml nach 24 h und 48 h Inkubation der HaCaT-Zellen mit CMC 21903.

### 5.5.2 Bestimmung von IL-2R im Zellkulturüberstand

Jeweils 25  $\mu$ l Zellkulturüberstand bzw. 25  $\mu$ l der Standards sowie 100  $\mu$ l ligandenmarkiertes IL-2R und 100  $\mu$ l enzymmarkiertes IL-2R wurden in die Wells des verwendeten Assays pipettiert. Danach folgten die in „Material und Methoden“ bereits beschriebenen weiteren

Versuchsschritte an deren Ende die Messung der optischen Dichten des erhaltenen Farbumschlags bei einer Wellenlänge von 450 nm stand. Diese stehen in direkter Relation zur IL-2R-Konzentration in den untersuchten Zellkulturüberständen.

Bei der Auswertung der gemessenen optischen Dichten der untersuchten Proben ergab sich weder im ELISA noch bei der Messung mittels des Immulite®-Festphasen-Chemiluminiszenz-Enzymimmunoassays ein Unterschied zur optischen Dichte des Leerwertes, so dass wir davon ausgehen, dass keine messbare IL-2R-Expression der Keratinozyten stattgefunden hat.

### **5.5.3 Bestimmung von IL-6 im Zellkulturüberstand**

Jeweils 100 µl Zellkulturüberstand bzw. 100 µl der Standards sowie 150 µl Probenpuffer wurden in die Wells des verwendeten Assays pipettiert. Danach folgten die in „Material und Methoden“ beschriebenen weiteren Versuchsschritte an deren Ende die Messung der optischen Dichten des erhaltenen Farbumschlags bei einer Wellenlänge von 450 nm stand. Diese stehen in direkter Relation zur IL-6-Konzentration in den untersuchten Zellkulturüberständen.

Im Ergebnis war ein Peak der IL-6-Expression in den untersuchten Zellkulturüberständen bei einer CMC 21903-Konzentrationen von 0,50 % zu verzeichnen. Nach 24 h Inkubation wurde dort ein IL-6-Gehalt von 91 pg/ ml, nach 48 h von 97 pg/ ml gemessen. Ab CMC-Konzentrationen von > 0,50 % fiel der IL-6-Gehalt wieder ab.

Im zeitlichen Vergleich ergaben sich bei den 48 h-Werten höhere Beträge an IL-6 als nach 24 h.

Die mitgeführten Kontrollen (SFM pur = BW) wiesen keinen messbaren IL-6-Gehalt auf (Abb. 11).

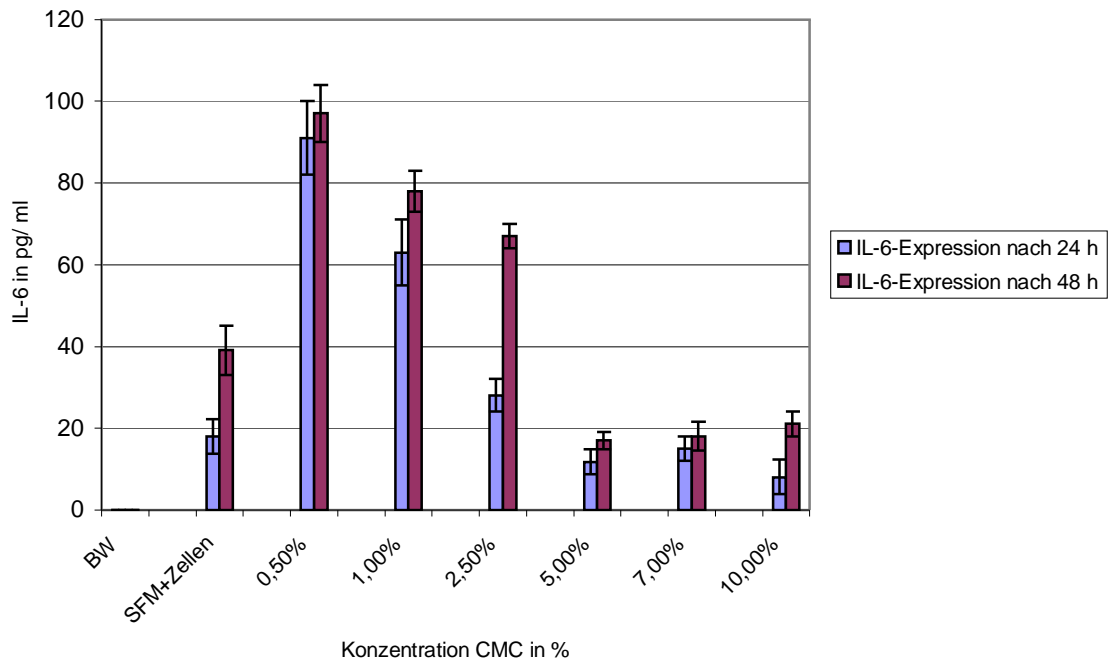


Abb. 11: Expression von **IL-6** in pg/ ml nach 24 h und 48 h Inkubation der HaCaT-Zellen mit CMC 21903.

#### 5.5.4 Bestimmung von **IL-8** im Zellkulturüberstand

Die Expression von IL-8 in den untersuchten Zellkulturüberständen wurde mittels des bereits im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebenen Immulite®-Festphasen-Chemiluminiszenz-Enzymimmunoassays gemessen.

Es zeigte sich bei der Auswertung der Messergebnisse ein zunächst stetiger Anstieg der IL-8-Expression, mit einem maximalen Wert bei CMC-Konzentrationen von 2,50 % (nach 24 h Inkubation 204 pg/ ml, nach 48 h 302 pg/ ml), gefolgt von einem erneuten Abfall der IL-8-Gehaltes bei CMC-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen > 2,50 % (Abb. 12). Auch hier war im zeitlichen Vergleich der 48 h-Wert höher als der gemessene Wert nach 24 h. Die mitgeführten Kontrollen (SFM pur = BW) wiesen keinen messbaren IL-8-Gehalt auf.

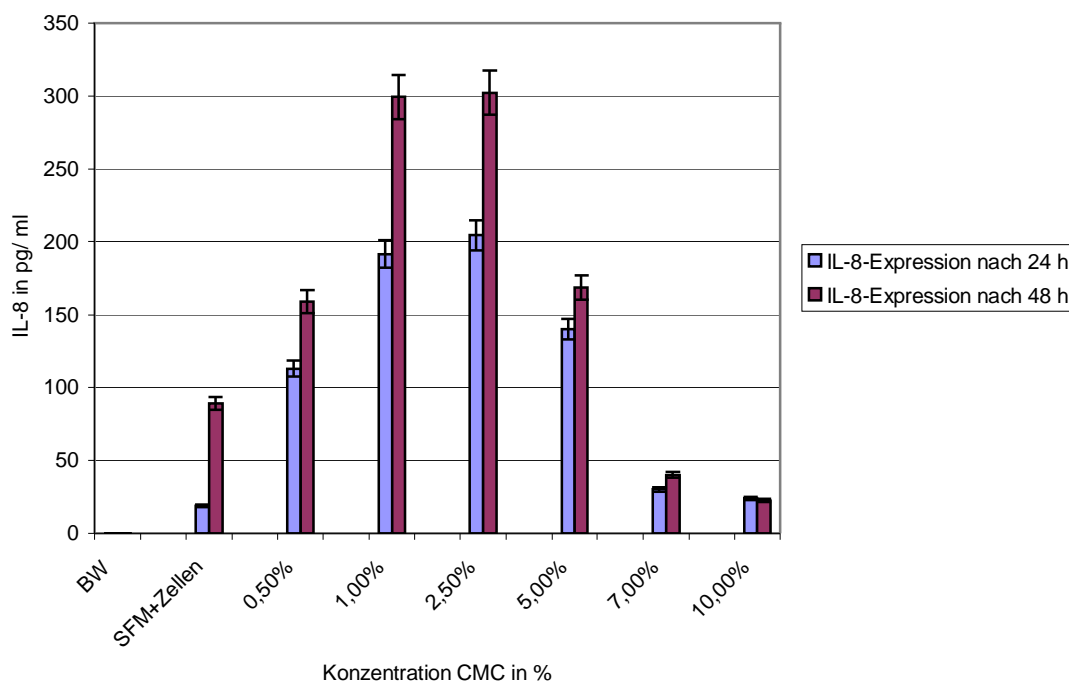


Abb. 12: Expression von **IL-8** in pg/ml nach 24 h und 48 h Inkubation der HaCaT-Zellen mit CMC 21903.

## 5.6 Die Bestimmung von NMP 41 im Zellkulturüberstand

Die quantitative Bestimmung von NMP 41 erfolgte mit dem Matri-Tect™ NMP 41™ Cell Death Test Kit, einem enzymatischen Immunoassay.

In unseren Untersuchungen war NMP 41 in keinem der Zellkulturüberstände in messbaren Konzentrationen nachweisbar, so dass wir davon ausgehen können, dass die untersuchte Carboxymethylcellulose kein Auslöser für Apoptosevorgänge ist bzw. über kein zytotoxisches Potential verfügt.

## 5.7. Die Bestimmung von Freien Sauerstoffradikalen (ROS)

Bei dieser Untersuchung wurde die Fähigkeit von HaCaT-Zellen beurteilt, freie Sauerstoffradikale zu generieren.

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde die Anzahl der HaCaT-Zellen in den Wells der Mikrotiterplatten mit Hilfe des Fluoreszenz-Messsystems CytoFluor 2300 der Fa. Millipore unter Verwendung des Farbstoffs 33342 der Fa. Hoechst beurteilt (Fluores-

zenzwellenlängen: Excitation 360 nm, Emission 460 nm), um später Aussagen über das Verhältnis zwischen der Zellzahl und der Menge an produzierten ROS treffen zu können (Abb. 13, Abb. 15).

Nach Zugabe von 2',7'-DCFH-DA in die Wells der Mikrotiterplatten wählten wir verschiedene Inkubationszeiten (Versuchsansatz 1 mit 24 h CMC-Inkub.: 60 min, 75 min, 120 min, 165 min, 225 min; Versuchsansatz 2 mit 48 h CMC-Inkub.: 60 min, 90 min, 12 h, 14 h), nach deren Ablauf dann DCF quantitativ bestimmt werden konnte. Der Gehalt an DCF korreliert mit der Menge an gebildeten ROS (Abb. 14, Abb. 16).

Im Ergebnis der ROS-Messungen zeigte sich bei dem ersten Versuchsansatz (24 h Inkubation mit CMC 21903) mit zunehmender Zellzahl (Abb. 13) ein sowohl zeitlicher als auch CMC- konzentrationsabhängiger Anstieg an produzierten freien Sauerstoffradikalen nach Inkubation mit 2', 7'-DCFH-DA (Abb. 14). Anhand der beiden Diagramme lässt sich zeigen, dass mit einer Erhöhung der Zellzahl - bei ansteigender CMC-Konzentration - in einem annähernd gleichen Verhältnis auch der Gehalt an ROS zunimmt. Im Bereich der größten Wachstumssteigerung, bei Inkubation der HaCaT-Zellen mit 10%iger CMC, ist nach einer Stunde ein Anstieg an freien Sauerstoffradikalen um über 500 % im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

Betrachtet man den weiteren zeitlichen Verlaufs dieser Messung, dann wird deutlich, dass bei einem längeren Aufenthalt der Zellen in der zur Messung erforderlichen Pufferlösung auch jeweils mehr Sauerstoffradikale gebildet werden. Am deutlichsten zeigt sich dies wieder bei den mit 10%iger CMC inkubierten Zellen, die ihre ROS-Produktion nach 225 min um fast 800 % gesteigert haben.

Im zweiten Versuch, der 48-stündigen Inkubation mit CMC 21903, kam es ebenfalls zeit- und konzentrationsabhängig zu einer verstärkten Bildung von Sauerstoffradikalen. Da nach der Inkubationszeit von 48 h mit CMC in SFM vergleichsweise die Zellzahl wesentlich höher war als in Versuchsansatz 1 (Abb. 15), war prozentual auch eine erhöhte ROS-Produktion zu verzeichnen (Abb. 16).

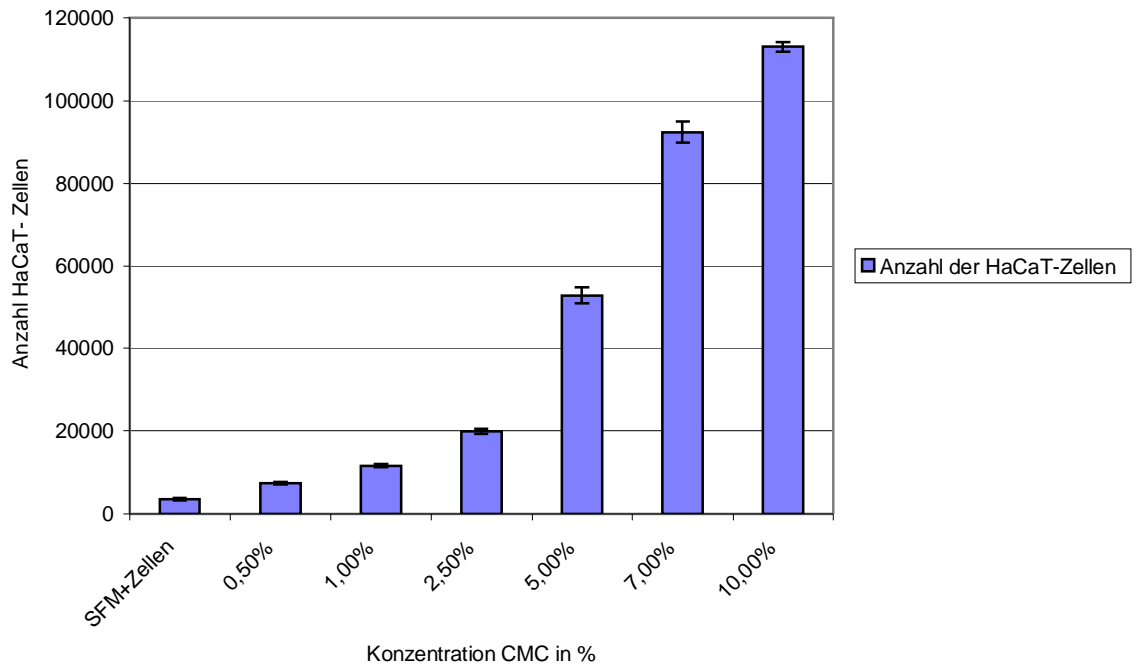


Abb. 13: Proliferation von HaCaT-Zellen unter Zugabe von CMC 21903 (Mittelwerte der Zellzahl und Standardfehler der Mittelwerte), 48 h Anwachsen in DMEM, 24 h CMC in SFM inkubiert.

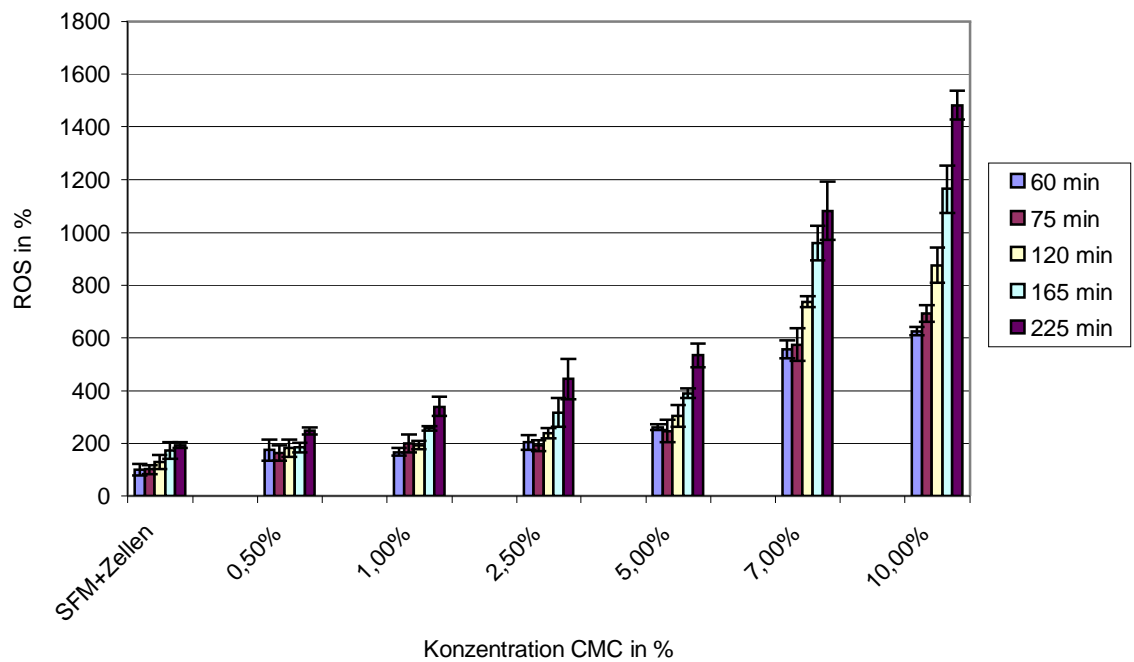


Abb. 14: Bestimmung von ROS in % nach 48 h Anwachsen der HaCaT-Zellen in DMEM, 24 h Inkubation mit CMC 21903 in SFM, Messung der ROS in % nach 60 min, 75 min, 120 min, 165 min, 225 min.

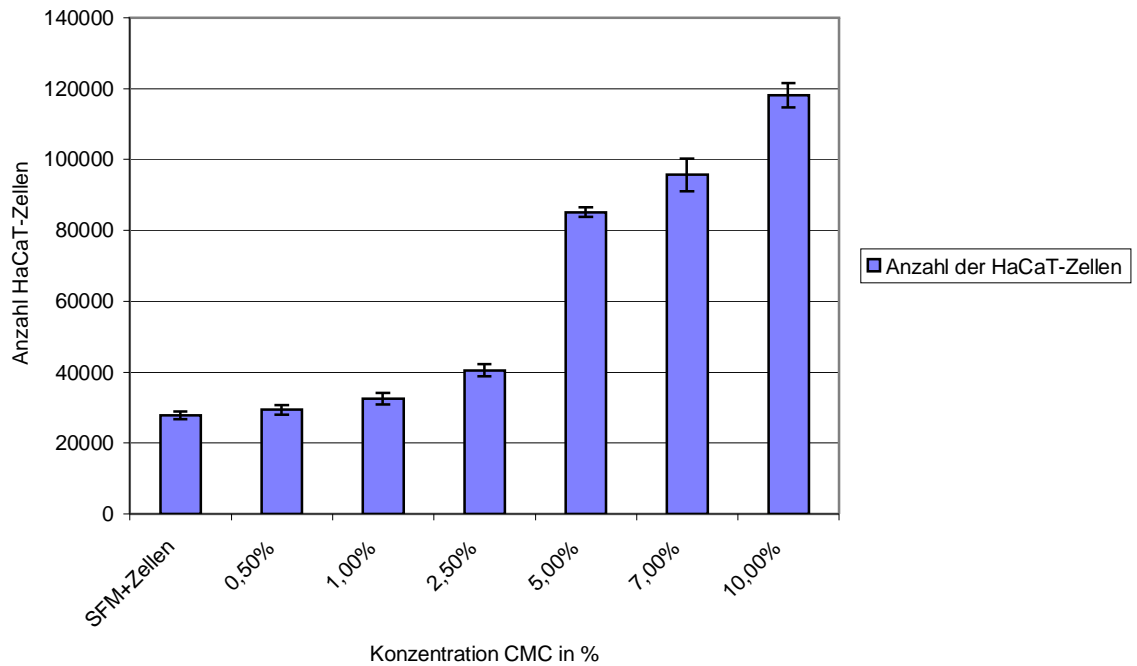


Abb. 15: Proliferation von HaCaT-Zellen unter Zugabe von CMC 21903, 48 h Anwachsen in DMEM, (Mittelwerte der Zellzahl und Standardfehler der Mittelwerte), 48 h CMC in SFM inkubiert.

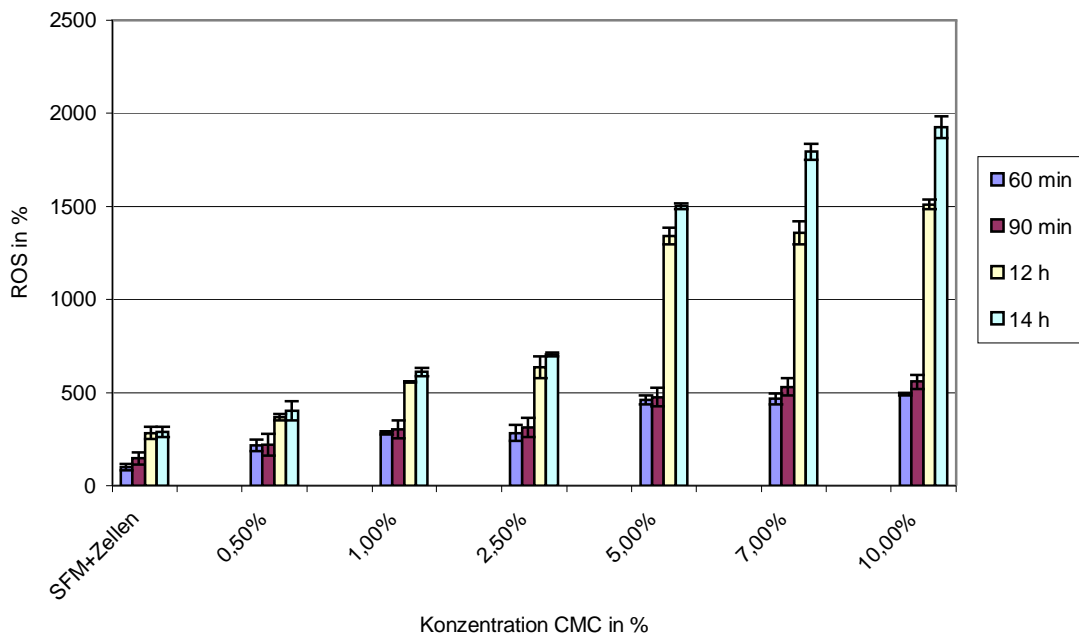


Abb. 16: Bestimmung von ROS in % nach 48 h Anwachsen der HaCaT-Zellen in DMEM, 48 h Inkubation mit CMC 21903 in SFM, Messung der ROS in % nach 60 min, 90 min, 12 h, 14 h.

## **6. DISKUSSION**

### **6.1 Der Einfluss der Carboxymethylcellulosen auf die Proliferation von HaCaT-Zellen**

Die Optimierung der Wundheilung erhält zunehmend sozialmedizinische Relevanz.

Viele Patienten sind aus den verschiedensten Gründen einer primär chirurgischen Therapie von Wunden nicht zugänglich, so dass eine konservative Behandlung versucht werden muss, welche oft sehr zeit- und kostenintensiv ist. Die genaue Wirkungsweise vieler derzeit auf dem Markt erhältlicher Wundverbandprodukte ist nicht hinreichend untersucht, so dass viele Wirkungen eher auf Zufälligkeiten beruhen und die Anwendung oft auf rein klinischen Erfahrungen basiert. Um Behandlungskosten sinnvoll zu optimieren, unerwünschte Nebenwirkungen für den Patienten zu reduzieren, den gesamten Wundheilungsprozess günstig zu beeinflussen, macht es sich notwendig, die verwendeten Inhaltsstoffe in den angewendeten Produkten genauer auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten und bereits in einer Anzahl von Wundverbänden als quellfähiger Bestandteil enthaltenen Carboxymethylcellulosen finden aufgrund ihrer Biokompatibilität und biologischen Abbaubarkeit zunehmend praktisches und wissenschaftliches Interesse als alternative Rohstoffquelle zur Lösung globaler Umwelt- und Ressourcenprobleme.

In dieser Arbeit beschäftigten wir uns speziell mit ihrem Einfluss auf das Wachstumsverhalten, die Zytokinliberation und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen humaner Keratinozyten *in vitro*.

Aufbauend auf Untersuchungen aus der organischen Chemie, die neue Synthesekonzepte zum Design von ionischen Funktionspolymeren aus Cellulose entwickelt und innovative Analyseverfahren für diese Stoffklasse etabliert haben (Heinze, 1998) sowie auf praktischen Erfahrungsberichten zum Einsatz dieser Stoffklasse als temporärer Hautersatz bei chronischen Wunden (Fontana et al., 1990, 1991), war es Ziel dieser Arbeit zu klären, inwieweit strukturelle Unterschiede der einzelnen Cellulosen Einfluss auf ihre Wirksamkeit als Wundverband haben.

Als Zellkulturmodell diente die spontan immortale humane Keratinozytenzelllinie HaCaT, die weitestgehend die Eigenschaften normaler Keratinozyten besitzt.



Als Zellkulturmedium verwendeten wir DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) der Fa. Biochrom, welches zusätzlich mit hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS), Penicillin-Streptomycin-Fungicin und L-Glutamin versetzt wurde (in 500 ml Medium 50 ml FKS, 5 ml PSF, 10 ml 200M L-Glutamin).

Während der Versuche mit Carboxymethylcellulose kam serumfreies Keratinozytenmedium (Defined Keratinocyte-SFM) der Fa. GIBCO BRL zur Anwendung, um einen möglichen Einfluss von im DMEM beinhalteten Substanzen auf die Untersuchungen auszuschließen.

In der hier durchgeführten in-vitro-Studie wurde zuerst der Einfluss von 5 verschiedenen, in SFM gelösten, Carboxymethylcellulosen mit unterschiedlichem Substitutionsgrad auf das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten untersucht.

Von den verwendeten Carboxymethylcellulosen wurden jeweils Lösungen in identischen Verdünnungsreihen (6 unterschiedliche CMC-Konzentrationen zwischen 0,50 % - 10 %) angefertigt und diese auf die bereits 48 h in Mikrotiterplatten angewachsenen HaCaT-Zellen aufgebracht. Parallel dazu erfolgte die Beurteilung des Wachstumsverhaltens der HaCaT-Zellen ohne CMC-Stimulation. Die Proliferationsmessungen erfolgten jeweils nach 24 h und 48 h CMC-Inkubation.

Bei 4 der 5 untersuchten Carboxymethylcellulosen kam es zu einem zeit- und konzentrationsabhängigen Proliferationsanstieg der HaCaT-Zellen.

Den stärksten positiven Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Keratinozyten zeigte die CMC FiSi (DS = 0,85). Nach 24 h Inkubation kam es ab einer CMC-Konzentration von 5 % und nach 48 h Inkubation ab einer CMC-Konzentration von 2,5 % zu einer deutlichen Steigerung der Proliferationsrate. Bei maximal verwendeter CMC-Konzentration von 10 % nach 24 h betrug der prozentuale Zuwachs an HaCaT-Zellen über 650 %, nach 48 h noch 580 %.

Bei der Auswertung der Daten wurde deutlich, dass die Wachstumssteigerung der Keratinozyten mit ansteigendem Substitutionsgrad der Carboxymethylcellulosen abnahm.

So war bei der CMC 85B/31 (DS = 1,70), die durch eine erneute Carboxymethylierung aus der CMC FiSi hervorgegangen war, die Proliferationsfreudigkeit der untersuchten HaCaT-Zellen deutlich geringer, und der Anstieg betrug nach 24 h bei der maximal verwendeten 10%igen CMC-Konzentration 185 %, nach 48 h Inkubation nur noch 160 %.

Die nochmals carboxymethylierte Form CMC 85B/31' (DS = 2,26) konnte nach 24 h und 48 h Inkubation keinen deutlichen Proliferationszuwachs der Keratinozyten im Vergleich zur Kontrolle mehr auslösen.

In Hinblick auf das **Proliferationsverhalten** der untersuchten HaCaT-Zellen kamen wir zu den folgenden Ergebnissen:

- Das Proliferationsverhalten der Keratinozyten ist abhängig von der verwendeten **Carboxymethylcellulose**.
- Die quantitative Vermehrung der Keratinozyten ist vom **Substitutionsgrad** der jeweiligen Carboxymethylcellulose abhängig. Bei gleichem CMC-Ausgangsstoff nimmt mit steigendem Substitutionsgrad der CMC die Wachstumsfreudigkeit der Zellen ab.
- Die Zunahme der Keratinozyten-Wachstumsrate ist abhängig von der verwendeten **Konzentration** der in SFM gelösten Carboxymethylcellulosen, mit steigender CMC-Konzentration nimmt auch die Proliferation zu.
- Das Keratinozyten-Wachstum ist von der **Zeit** abhängig, nach 48stündiger Inkubation mit CMC ist eine Zunahme im Vergleich zum 24 h- Wert zu verzeichnen. Allerdings muss hierbei angemerkt werden, dass nach einer zweitägigen Anheftungszeit der Zellen und anschließenden weiteren 48 h Inkubation mit CMC durch die teilweise extreme Zellvermehrung das Zell-Nährmedium in den einzelnen Wells der Mikrotiterplatten nahezu verbraucht sein dürfte, die Proliferationsfähigkeit also aus diesem Grunde zurückgeht (Abb. 6).

Aufgrund dieser Ergebnisse gehen wir davon aus, dass die von uns untersuchten Carboxymethylcellulosen unter in-vitro-Bedingungen biologische Aktivität in bezug auf die Proliferationsfähigkeit der HaCaT-Zellen zeigen. Wie bereits erläutert, nimmt die Viskosität der hergestellten unterschiedlichen CMC-Lösungen mit steigender CMC-Konzentration zu, und es entsteht eine Art weiches kolloidales Gel, welches sich dem Zellverband anpasst und im entstandenen Mikromilieu für die HaCaT-Zellen solch ideale Wachstumsbedingungen schafft, wie sie heute von modernen synthetischen Wundverbänden zu fordern sind.

So soll die Wundauflage ein feuchtes Heilungsmilieu garantieren, Wundinfektionen und Verschorfungen vermeiden helfen. Das Material soll frei von toxischen Bestandteilen sein, keinerlei Fremdkörperreaktionen hervorrufen und biokompatibel sein. Eine optimale Umgebungstemperatur sowie ein angemessener pH- Wert sind zu garantieren. Ferner ist ein Gasaustausch zwischen Wunde und Umgebung erwünscht (Wollina, 1995).

Die untersuchten Carboxymethylcellulosen erfüllen somit die gestellten Anforderungen, sie schützen die Zellen vor Dehydratation und Infektionen. Waring et al. (2001) untersuchten die allgemeinen physiko-chemischen Eigenschaften von Carboxymethylcellulose und

stellten fest, dass durch die Fähigkeit der CMC zur Gelbildung Flüssigkeit immobilisiert wird, was bei der Wundbehandlung Vorteile bringt, da dadurch eine Mazeration der Wundumgebung deutlich eingeschränkt werden kann.

Außerdem ist das Material nicht toxisch, physiologisch unbedenklich, biologisch abbaubar und somit auch insgesamt biokompatibel (Ullmann et al., 1987).

Gerade die letztgenannten Eigenschaften können von vielen, derzeit auf dem Markt erhältlichen, Wundverbänden oft nicht in dem selben Maße reproduziert werden. Untersuchungen von Wollina et al. (1996) zeigten, dass sich eine Reihe von Wundauflagen nicht inert gegenüber den Zellen im Wundgebiet verhielten, Fremdkörperreaktionen induzierten, zytotoxische Effekte aufwiesen und die Zellmorphologie veränderten.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch van Luyn et al. (1992), die bei einigen Wundauflagen eine ausgeprägte Inhibition des Zellwachstums *in vitro* nachwiesen.

Diese Untersuchungen stehen in einem scheinbaren Widerspruch zu den *in-vivo*-Tests von handelsüblichen Wundauflagen, bei denen meist gute Ergebnisse bei der Heilung von Wunden erzielt wurden. Eine Begründung dafür dürfte unter anderem die relativ hohe Sensibilität der bei *in-vitro*-Untersuchungen häufig verwendeten HaCaT-Zellen im Vergleich zu normalen Hautzellen *in vivo* sein, wie bereits Korting et al. (1994) vermuteten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die als Wundauflage bzw. als Inhaltsstoff in Wundverbänden geeigneten chemisch reinen Carboxymethylcellulosen in, soweit technisch möglich, hohen Konzentrationen über einen längeren Zeitraum auf der geschädigten Haut verbleiben sollten. Unseren Untersuchungen zufolge eignen sich speziell Carboxymethylcellulosen mit einem relativ niedrigen Substitutionsgrad zur Unterstützung der Wundheilung.

## 6.2 Der Einfluss von Carboxymethylcellulose auf die Liberation ausgewählter Interleukine

Zur weiteren Aufklärung der Ursachen für den stimulierenden Einfluss der Carboxymethylcellulosen auf das Wachstumsverhalten der Keratinozyten untersuchten wir quantitativ die Freisetzung verschiedener Interleukine während der Inkubation mit Carboxymethylcellulose. Exemplarisch wählten wir hierfür die CMC 21903 aus, die, wie bereits beschrieben, einen stark proliferationsfördernden Effekt auf die Hautzellen zeigte.

Die während des Wundheilungsprozesses auftretenden Phasen der Entzündung, Reepithelialisierung und Bildung von Granulationsgewebe werden unter anderem von einem ganzen Komplex aus Wachstumsfaktoren und Cytokinen gesteuert, welche sich gegenseitig beeinflussen können und koordiniert in das Verletzungsgebiet sezerniert werden. Sporri et al. (1996) beschrieben, dass IL-1 $\beta$ , welches als zellassoziertes Cytokin unter anderem von dermalen Fibroblasten produziert wird, T-Zellen stimuliert und somit als wichtiger Mediator bei der Immunantwort und im Bereich der Wundheilung gelten kann.

Ziel der heutigen Forschung ist es, die im Wundheilungsprozess eine Rolle spielenden Mediatoren weiter zu identifizieren und ihre genauen Funktionen zu charakterisieren, um perspektivisch durch ihren gezielten Einsatz die Therapiemöglichkeiten in der Wundheilung weiter zu optimieren (Gillitzer et al., 2000). Allerdings ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt relativ wenig über die Konzentrationen der bei der Wundheilung auftretenden Cytokine und Wachstumsfaktoren bekannt. Verschiedene Untersuchungen berichten darüber, dass der Gehalt an Cytokinen und Wachstumsfaktoren direkt im Wundgebiet wesentlich höher ist als der im Plasma messbare (Holzheimer et al. 2000).

Bei unseren Messungen konzentrierten wir uns auf die quantitative Bestimmung der Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-2R, IL-6 und IL-8 in den nach 24 h und 48 h Inkubation mit Carboxymethylcellulose gewonnenen Zellkulturüberständen. Dabei konnten wir feststellen, dass die IL-1 $\beta$ -Expression in den Zellkulturüberständen mit hoher CMC-Konzentration (ab 5,00 %) die, wie bereits beschrieben, einen starken Proliferationsschub bei den HaCaT-Zellen zur Folge hatte, ebenfalls anstieg und mit steigender CMC-Konzentration bzw. Zellzahl weiter zunahm. Der Vergleich der quantitativen Messungen an IL-1 $\beta$  nach 24 h und 48 h brachte keinen signifikanten Unterschied, so dass zumindest in dem von uns untersuchten Zeitintervall keine temporäre Abhängigkeit der IL-1 $\beta$ -Expression bestand.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Heinemann et al. (1997), die in vitro Monozyten mit hitzeinaktivierten *Candida albicans* stimulierten und bei deren Untersuchungen IL-1 $\beta$

das einzige überhaupt messbare Cytokin nach 24 h Inkubation mit *C. albicans* war, dessen Expression im zeitlichen Verlauf weiter abnahm. In Untersuchungen von Wang et al. (1997) wurden HaCaT-Zellen mit dem gram-positiven Bakterium *Streptococcus pyogenes* infiziert, was bereits nach 2 h Inkubation zu einem 7fachen Anstieg des IL-1 $\beta$ -Gehaltes in den Zellkulturüberständen führte, der nach weiteren 2 h wieder abnahm und in den nächsten Stunden relativ konstant blieb. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit Untersuchungen von Kondo und Ohshima (1996), die die Dynamik von Interleukinen im Wundheilungsprozess bei Mäusen untersuchten und feststellten, dass speziell IL-1 $\beta$  ein Marker für den zeitigen Wundheilungsbeginn ist.

IL-1 $\beta$  gilt als biologisch aktives Molekül, welches sowohl als lokales als auch als systemisches interzelluläres Signal bei Immun- und Entzündungsreaktionen wirkt. Fast alle Zellen des Organismus (außer T-Lymphozyten) können nach Stimulation IL-1 produzieren und sezernieren. Die Fähigkeit der Keratinozyten, dass von ihnen produziertes IL-1 auch die Expression von weiteren Cytokinen, inklusive die eigene IL-1-Ausschüttung, stimuliert, wurde bereits von Ansel et al. (1990) und Kupper (1990) beschrieben. So unterstützt IL-1 auch die Bildung von zwei weiteren, von uns quantitativ mit Hilfe von Enzym-Immunoassays bestimmten Cytokinen, dem IL-6 und dem IL-8.

Bei beiden Cytokinen fiel dabei ein ähnlicher CMC-konzentrationsabhängiger Expressionsmodus auf. Auch die nicht mit CMC stimulierten Keratinozyten zeigten bei beiden Interleukinen eine messbare Basalsekretion an IL-6 und IL-8, was unter anderem darauf zurückgeführt werden kann, dass eine ständige Stimulation der Keratinozyten durch die jeweilige Umgebung erfolgt, die mit spezifischen Interleukinausschüttungen beantwortet wird.

Die höchsten Level an IL-6 wurden im Zellkulturüberstand bei einer CMC-Konzentration von 0,50 % (nach 24 h Inkubation mit CMC 21903 91 pg/ ml, nach 48 h Inkubation mit CMC 97 pg/ ml) gemessen, die bei weiterem CMC-Konzentrationsanstieg wieder abfielen und ab einer CMC-Konzentration von 5,00 % unterhalb des Basalwertes lagen. CMC 21903 scheint demzufolge ein Wirkungsmaximum zur IL-6-Ausschüttung im CMC-Konzentrationsbereich von 0,50 % - 2,50 % zu haben.

Außerdem stellten wir fest, dass der IL-6- Gehalt nach 48 h Inkubation mit CMC im Vergleich zum 24 h-Wert jeweils leicht erhöht war. Auch bei den Untersuchungen von Kondo und Ohshima (1996) sowie von Mateo et al. (1994) war ein Peak von IL-6 erst relativ spät im Vergleich zu anderen Cytokinen zu verzeichnen, was auch damit erklärbar ist, dass die IL-6-Bildung bei Keratinozyten - neben einer geringen Dauersekretion - hauptsächlich erst

durch andere Cytokine, z. B. IL-1, IL-4 oder beispielsweise auch durch UV-Strahlung induziert wird (Paquet et al., 1996).

Die messbare Expression der HaCaT-Zellen von IL-6 ist also unserer Meinung nach auf die Stimulation durch die Carboxymethylcellulose zurückzuführen und beruht auf ähnlichen Mechanismen, wie sie beispielsweise bei der Infektionsabwehr, der Immunabwehr oder der Induktion von Akute-Phase-Reaktionen, bei denen IL-6 jeweils eine zentrale Rolle spielt, funktionieren.

Es ist bekannt, dass IL-6 ebenfalls wachstums- und differenzierungsinduzierende Aktivitäten bei verschiedenen Zellarten aufweist, so dass durch die von der Carboxymethylcellulose stimulierte Sekretion von IL-6 als eine Ursache für die proliferationsfördernde Wirkung der Carboxymethylcellulose auf die untersuchten Keratinozyten gesehen werden kann.

Auch IL-8 ist ein Cytokin, dessen Synthese durch eine erfolgte IL-1 $\beta$ -Sekretion stimuliert wird und eine wichtige Rolle bei lokalen Entzündungsreaktionen spielt. Es wirkt dabei im Organismus chemotaktisch auf T-Lymphozyten und auf neutrophile Granulozyten.

Ähnlich wie bei IL-6 zeigte sich in unseren Messungen ein durch die CMC-Stimulation hervorgerufenes Wirkoptimum für IL-8 bei CMC-Konzentrationen von 1,00 % - 2,50 % (nach 24 h Inkubation mit 1,00%iger CMC 192 pg/ ml, nach 48 h Inkubation mit 1,00%iger CMC 300 pg/ ml; nach 24 h Inkubation mit 2,50%iger CMC 204 pg/ ml, nach 48 h Inkubation mit 2,50%iger CMC 302 pg/ ml). Dabei ist neben der CMC-Konzentrationsabhängigkeit auch eine zeitliche Abhängigkeit ersichtlich, die IL-8-Sekretion war nach 48 h Inkubation mit CMC deutlich erhöht.

In Untersuchungen von Wang et al. (1997) zum zeitlichen Verlauf der Expression verschiedener Cytokine wird hingegen berichtet, dass IL-8 ähnlich dem IL-1 bereits in den ersten Stunden nach Stimulation der Keratinozyten mit A-Streptokokken seinen Peak erreicht. Auch Holzheimer et al. (2000) wiesen die höchsten IL-8-Konzentrationen im in-vivo-Wundfluid bereits 4 h nach einem operativen Eingriff nach. Im Gegensatz dazu zeigten die Resultate von Rennekampff et al. (2000) ansteigende IL-8-Level vom 1. bis 5. postoperativen Tag. Vom gleichen Autor durchgeführte in-vitro-Versuche zum direkten Einfluss von IL-8 auf die Proliferation von Keratinozyten bestätigen unsere Ergebnisse, da auch hier eine starke Vermehrungstendenz der Hautzellen unter IL-8-Einfluss beobachtet werden konnte. Belegt wurde dieses Erkenntnis auch durch in-vivo-Untersuchungen an Mäusen, so dass sich vermuten lässt, dass lokal appliziertes IL-8 in der Wundheilungstherapie von Nutzen sein kann.

Eine messbare IL-2-Rezeptor-Expression der HaCaT-Zellen konnte in unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden. In der Literatur wurden erhöhte IL-2R-Spiegel vor allem bei malignen Tumoren und bei allergischen bzw. entzündlichen Geschehen gefunden. IL-2R wird von einigen Autoren als Marker für die Aktivität von atopischen Ekzemen und Psoriasis eingestuft.

Der hochaffine IL-2-Rezeptor ist ein Heterodimer, aus einer H-Kette und einer L-Kette bestehend. Die H-Kette ist bereits auf ruhenden Zellen nachweisbar, die L-Kette wird erst nach Aktivierung durch die hochaffine IL-2-Bindung an ein komplettes IL-2-Rezeptor-Dimer exprimiert. Voraussetzung für eine Synthese von IL-2 ist die Reaktion antigenspezifischer T-Zellen mit dem Antigen, das von antigenpräsentierenden Zellen gemeinsam mit HLA-Strukturen präsentiert wird. Erst wenn diese beiden Signale auftreten, kann das IL-2 der antigenpräsentierenden Zelle die IL-2-Synthese in aktivierten T-Zellen in Gang setzen (Friemel, 1990) und entzündliche bzw. allergische Reaktionen in Gang setzen.

Die hier untersuchte Carboxymethylcellulose 21903 initiierte kein derartiges Geschehen.

### **6.3 Der Einfluss von Carboxymethylcellulose auf die Freisetzung von NMP 41**

Der Terminus Apoptosis beschreibt einen bestimmten Zelltodmechanismus, welcher durch charakteristische morphologische Merkmale, wie die Schädigung der Plasmamembran, die Kondensation von Kernchromatin, die Zellschrumpfung und -fragmentation und schließlich die Aufnahme der apoptotischen Zellkörper durch benachbarte Zellen gekennzeichnet ist.

Der von uns verwendete Matri-Tect™ NMP 41™ Cell Death Test Kit ist ein enzymatischer Immunoassay, welcher quantitativ das Kernmatrixprotein 41 (NMP 41) bestimmt, welches von toten oder sterbenden Zellen freigesetzt wird und so Aussagen über Zytotoxizität und Apoptosevorgänge ermöglicht.

NMP 41 war bei unseren Untersuchungen in keinem der Zellkulturüberstände in messbaren Konzentrationen nachweisbar, so dass wir davon ausgehen können, dass die untersuchte Carboxymethylcellulose kein Auslöser für Apoptosevorgänge ist bzw. über kein zytotoxisches Potential verfügt.

## 6.4 Der Einfluss von Carboxymethylcellulose auf die Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS)

Mit Hilfe einer Fluoreszenzanalyse konnten Aussagen zum Einfluss von Carboxymethylcellulose unterschiedlicher Konzentration auf die Fähigkeit humaner Keratinozyten freie Sauerstoffradikale (Reactive Oxygen Species = ROS) zu bilden, getroffen werden.

Reactive Oxygen Species erfüllen vielfältige Aufgaben, sowohl im Rahmen der Zellphysiologie als auch bei pathologischen Prozessen. Alle lebenden Zellarten generieren ständig unterschiedlich große Mengen an ROS - während normaler Stoffwechselvorgänge bzw. auch als Antwort auf Hormon- oder Wachstumsfaktorstimulation. Goldman et al. (1998) veröffentlichten Ergebnisse, denen zufolge die ROS-Produktion von HaCaT-Zellen unter dem Einfluss von Epidermal growth factor (EGF), Bradykinin und Thapsigargin zeit- und dosisabhängig deutlich anstieg. Extrazelluläres Calcium  $[Ca^{2+}]$  sowie ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  ist nach Goldman et al. (ebenda) essentiell für eine erhöhte ROS-Produktion. Sowohl EGF als auch Bradykinin und Thapsigargin evozierten einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Kinetik des Anstieges der  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration war identisch mit der jeweiligen Kinetik der ROS-Produktion.

Dieses Ergebnis ist auch insofern interessant, als dass sowohl  $[Ca^{2+}]_i$  als auch ROS als Second messengers bei Prozessen wie Zellproliferation, Differenzierung und Apoptosis eine Rolle spielen.

Wie in Untersuchungen von Schröter et al. (2000) anhand von Pilzsporen der Gattungen *Candida albicans* bereits nachgewiesen, fanden auch wir eine direkte Abhängigkeit der Menge an generierten ROS zur jeweils vorhandenen Zellzahl.

Mit ansteigender CMC-Konzentration und der bereits nachgewiesenen damit verbundenen Proliferationssteigerung der HaCaT-Zellen nahm auch der Gehalt an freien Sauerstoffradikalen zu.

Wieder ließ sich außerdem ein Bezug zur Inkubationszeit mit Carboxymethylcellulose herstellen. Nach nur 24 h Inkubation mit CMC und damit verbundener niedrigerer Zellzahl als nach 48 h Inkubation war auch die Menge der von den Zellen gebildeten freien Sauerstoffradikale deutlich geringer.

Da nach den bisherigen Untersuchungen davon ausgegangen werden kann, dass die verwendete Carboxymethylcellulose keine negativen Auswirkungen auf das Zellwachstum hat, ist der Anstieg an ROS primär nicht mit einer durch die CMC ausgelösten Stresssitua-



tion für die Zellen zu erklären. Wohingegen bei den 5 jeweils zeitlich versetzten Messreihen und dem dabei deutlich sichtbaren Anstieg an freien Sauerstoffradikalen der Stressfaktor mit Sicherheit einen großen Einfluss hat. Die Zellen wurden während der gesamten Messdauer in einer Pufferlösung gehalten, die keinerlei Nährmedium enthielt, was einer Stresssituation entspricht.

Der Einfluss von verschiedenen Stressfaktoren auf unterschiedliche Zellarten ist bereits mehrfach untersucht worden. So zeigten beispielsweise Lawley et al. (2000), dass ultravioletter Strahlung ausgesetzte Keratinozyten vermehrt ROS produzieren, als Resultat der mit der Bestrahlung verbundenen Zellschädigung.

## 7. SCHLUSSFOLGERUNGEN

In der vorliegenden Dissertation wurde die Bioreaktivität von humanen Keratinozyten auf Carboxymethylcellulose in vitro untersucht. Wir verwendeten 5 Carboxymethylcellulosen unterschiedlichen Substitutionsgrades. Die Untersuchungen wurden an der spontan immortalen Keratinozytenzelllinie HaCaT (40. bis 55. Passage) durchgeführt.

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen zum Einfluss der CMC auf das Proliferationsverhalten der HaCaT-Zellen lässt sich schlussfolgern, dass sich die Zugabe von CMC, abhängig von ihrer Konzentration und der Inkubationszeit mit den Zellen, insgesamt positiv auf die quantitative Vermehrung der Zellen auswirkt und in Einzelfällen Proliferationssteigerungen um bis zu 500 % erzielt. Eine wichtige Rolle spielt dabei der jeweilige Substitutionsgrad (Degree of Substitution = DS) der verwendeten Carboxymethylcellulosen. Die CMC mit einem vergleichsweise niedrigen DS induziert die eindrucksvollsten Proliferationsanstiege bei den in-vitro-Zellkulturen.

Untersuchungen zum Einfluss der Carboxymethylcellulose auf die Expression verschiedener Interleukine bestätigen die positive Auswirkung der CMC auf das quantitative Wachstum der humanen Keratinozyten.

Es lassen sich weiterhin keinerlei zytotoxische Eigenschaften der verwendeten CMC nachweisen.

Bei der Bestimmung freier Sauerstoffradikale zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen vorhandener Zellzahl und der Menge an produzierten ROS, woraus wir schlussfolgern, dass die untersuchte CMC keinen schädigenden Einfluss auf die Keratinozyten ausübt, diese sich durch die Inkubation mit CMC in keiner Stresssituation befinden.

Insgesamt gehen wir davon aus, dass die von uns untersuchten Carboxymethylcellulosen unter in-vitro-Bedingungen biologische Aktivität in Bezug auf die Proliferationsfähigkeit der HaCaT-Zellen zeigen, für diese solch ideale Wachstumsbedingungen im entstandenen Mikromilieu induzieren, wie sie von modernen synthetischen Wundverbänden zu fordern sind und sie somit für einen Einsatz als Wundtherapeutikum in Frage kommen.

In weiterführenden Untersuchungen sollte der in dieser Arbeit aufgezeigte Einfluss des Substitutionsgrades der Carboxymethylcellulosen auf das Proliferationsverhalten humaner Keratinozyten genauer untersucht werden, so dass das Biopolymer Carboxymethylcellulose in Zukunft gezielt als Therapeutikum bei der Wundheilung bzw. in anderen Einsatzgebieten, die eine Förderung des Wachstums von Zellen erfordern, genutzt werden kann.

## 8. ABBILDUNGEN UND TABELLEN

- Abb. 1: Flussschema zur Umwandlung von nicht- fluoreszierendem DCFH-DA in fluoreszierendes DCF durch ROS, nach LeBel et al. (1992).
- Abb. 2: Eichkurve zur Berechnung der Zellzahl aus den ermittelten AFU, Messung der AFU 12 h nach Einsaat der HaCaT-Zellen in die Mikrotiterplatten;  
Geradengleichung für die lineare Funktion  $f(x) = 0,0321x + 1031,2$ .
- Abb. 3: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit.
- Abb. 4: Proliferation von HaCaT-Zellen nach Inkubation mit CMC 21903 über 24 h, 48 h und 72 h; Proliferationssteigerung ab CMC-Konzentration von 2,50 % bei 24 h und 48 h; nach 72 h Inkubation ist kein deutlicher Proliferationsanstieg mehr zu verzeichnen.
- Abb. 5: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit CMC 21903 (DS = 0,70) in SFM.
- Abb. 6: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit CMC 21901 (DS = 0,92 ) in SFM.
- Abb. 7: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit CMC FiSi (DS = 0,85) in SFM.
- Abb. 8: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit CMC 85B/31 (DS = 1,70) in SFM.
- Abb. 9: Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen nach 48 h Anwachsen in DMEM und 24 h bzw. 48 h Inkubation mit CMC 85B/31' (DS = 2,26) in SFM.
- Abb. 10: Expression von IL-1 $\beta$  in pg/ ml nach 24 h und 48 h Inkubation der HaCaT-Zellen mit CMC 21903.

Abb. 11: Expression von IL-6 in pg/ ml nach 24 h und 48 h Inkubation der HaCaT-Zellen mit CMC 21903.

Abb. 12: Expression von IL-8 in pg/ ml nach 24 h und 48 h Inkubation der HaCaT-Zellen mit CMC 21903.

Abb. 13: Proliferation von HaCaT-Zellen unter Zugabe von CMC 21903, 48 h Anwachsen in DMEM, 24 h CMC in SFM inkubiert.

Abb. 14: Bestimmung von ROS in % nach 48 h Anwachsen der HaCaT-Zellen in DMEM, 24 h Inkubation mit CMC 21903 in SFM, Messung der ROS in % nach 60 min, 75 min, 120 min, 165 min, 225 min.

Abb. 15: Proliferation von HaCaT-Zellen unter Zugabe von CMC 21903, 48 h Anwachsen in DMEM, 48 h CMC in SFM inkubiert.

Abb. 16: Bestimmung von ROS in % nach 48 h Anwachsen der HaCaT-Zellen in DMEM, 48 h Inkubation mit CMC 21903 in SFM, Messung der ROS in % nach 60 min, 90 min, 12 h, 14 h.

Tab.1: Anwendungsgebiete der Natrium-Carboxymethylcellulose

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

Akira S, Taga T and Kishimoto T (1993) Interleukin-6 in Biology and Medicine. *Adv Immunol* 54:1-78.

Ansel J, Perry P, Brown J, Phan T, Hart C, Luger T and Hefeneider S (1990) Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 94:101-107.

Arguello F, Sterry JA, Zhao YZ, Alexander MR, Shoemaker RH and Cohen HJ (1996) Two serologic markers to monitor the engraftment, growth and temperature response of human leukemias in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 87:4325-4332.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A and Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761-771.

Burchard W (Hrsg.): Polysaccharides. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona (1985).

Colotta F, Sironi M, Borre A, Luini W, Maddalena F and Mantovani A (1992) Interleukin 4 amplifies monocyte chemotactic protein and interleukin 6 production by endothelial cells. *Cytokine* 4:24-28.

Caplan AI (2000) Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue Eng* Vol. 6:1-8.

Cathcart R, Schwieters E and Ames BN (1983) Detection of picomole levels of hydrogen-peroxide using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* 134:111-116.

Ebert G: Biopolymere, Struktur und Eigenschaften. B.G. Teubner-Verlag, Stuttgart (1993).

Eierdanz H (Hrsg.): Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (1996).

Elias HG: Makromoleküle. Hüthig & Wepf Verlag, Basel, Heidelberg, New York, Bd. 1: 283 ff. (1990).

Feddersen RL and Thorp SN: Sodium carboxymethylcellulose. In: Whistler RL and BeMiller JN (eds.): Industrial Gums, Polysaccharides and their Derivatives. Academic Press, San Diego, New York, Boston (1993) S. 537.

Fontana J, Franco V, De Souza S, Lyra I and De Souza A (1991) Nature of Plant Stimulators in the Production of *Acetobacter xylinum* ("Tea Fungus") Biofilm Used in Skin Therapy. *Appl Biochem Biotechnol* Vol. 28/29:341-351.

Fontana J, De Souza A, Fontana KC, Torriani I, Moreschi J, Gallotti B, De Souza S, Narcisco G, Bichara J and Farah L (1990) *Acetobacter cellulose pellicle* as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol* Vol. 24/25:253-264.

Franz G (Hrsg.): Polysaccharides. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona (1991).

Friemel H (1990) Interleukine 1-8. *Allerg Immunol* 36:195-208.

Fu YC, Jin XP, Wei SM, Lin HF and Kacew S (2000) Ultraviolet radiation and reactive oxygen generation as inducers of keratinocyte apoptosis: protective role of tea polyphenols. *J Toxicol Environ Health* 61:177-188.

Gebhardt M, Wenzel HC, Hipler UC, Herrmann D and Wollina U (1997) Monitoring of serologic immune parameters in inflammatory skin diseases. *Allergy* 52:1087-1094.

Gillitzer R, Toksoy A and Voss A (2000) Role of chemokines in human skin wound healing. *Zentralbl Chir* 125 Suppl. 1:56-59.

Goldman R, Moshonov S and Zor U (1998) Generation of reactive oxygen species in a human keratinocyte cell line: role of calcium. *Arch Biochem Biophys* 350:10-18.

Grossmann RM, Krüger J, Yourish F, Granelli-Piperno A, Murphy PD, May LT, Kupper TS, Sehgal P and Gottlieb AB (1989) Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriasis skin and stimulates proliferation in cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6367-6371.

Heinemann DE, Peters JH and Gahr M (1997) A Human In Vitro Granuloma Model Using Heat Killed *Candida albicans* Cells Immobilized on Plastic Culture Wells. *Scand J Immunol* 45:596-604.

Heinze T: Ionische Funktionspolymere aus Cellulose: Neue Synthesekonzepte, Struktur-aufklärung und Eigenschaften. Shaker Verlag, Aachen (1998).

Hergenrother P: Polysaccharides. In: Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menger G, Kroschwitz JJ, Wiley J and Sons (eds.): *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. (1985) Vol. 3:S. 226 ff..

Hipler UC, Wollina U, Denning D and Hipler B: Fluorescence analysis of reactive oxygen species (ROS) generated by six isolates of *Aspergillus fumigatus*. In: *Proceedings of 10<sup>th</sup> International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2000* (2001) S. 411-414.

Holzheimer RG and Steinmetz W (2000) Local and systemic concentrations of pro- and anti- inflammatory cytokines in human wounds. *Eur J Med Res* 5:347-355.

Howells G, Pham P, Taylor D, Foxwell B and Feldmann M (1991) Interleukin 4 induces interleukin-6-production by endothelial cells: Synergy with interferon  $\gamma$ . *Eur J Immunol* 21:97-101.

Keston AS and Brandt R (1965) The fluorometric analysis of ultramicroquantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 11:1-5.

Kirnbauer R, Köck A, Neuner P, Förster E, Krutmann J, Urbanski A, Schauer E, Ansel JC, Schwarz T and Luger TA (1991) Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J Invest Dermatol* 96:484-489.

Kondo T and Ohshima T (1996) The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination. *Int J Legal Med* 108:231-236.

Korting HC, Herzinger T, Hartinger A, Kerscher M, Angerpointer T and Maibach HI (1994) Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *J Dermatol Sci* 7:119-129.

Kupper TS (1990) The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol* 94:146-150.

Lafrance ML and Armstrong DW (1999) Novel living skin replacement biotherapy approach for wounded skin tissues. *Tissue Eng Vol. 5*:153-170.

Lawley W, Doherty A, Denniss S, Chauhan D, Pruijn G, van Venrooij WJ, Lunec J and Herbert K (2000) Rapid lupus autoantigen relocalization and reactive oxygen species accumulation following ultraviolet irradiation of human keratinocytes. *Rheumatology* 39:253-261.

LeBel CP, Ischiropoulos H and Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231.

Luger TA, Schwarz T, Krutmann J, Köck A, Urbanski A and Kirnbauer R (1990) Cytokines and the skin. *Curr Probl Dermatol* 19:35-49.

Mateo RB, Reichner JS and Albina JE (1994) Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol* 266:1840-1844.



Mohammed FA (2001) Topical permeation characteristics of diclofenac sodium from NaCMC gels in comparison with conventional gel formulations. *Drug Dev Ind Pharm* 27:1083-1097.

Ohne Autor (1918) Deutsche Celluloid Fabrik Eilenberg, Deutsches Patent 332.203.

Paquet P and Piérard GE (1996) Interleukin-6 and the skin. *Int Arch Allergy Immunol* 109:308-317.

Piaggese A, Baccetti F, Rizzo L, Romanelli M, Navalesi R and Benzi L (2001) Sodium carboxyl-methyl-cellulose dressings in the management of deep ulcerations of diabetic foot. *Diabet Med* 18:320-324.

Prüfer K und Wollina U (1994) Nichtradioaktive Bestimmung des Zellwachstums. *Z Dermatol* 180:143-148.

Puls J und Heinze T (1997) Unveröffentlichte Ergebnisse der Kooperation im Schwerpunktprogramm der DFG "Cellulose und Cellulosederivate - molekulares und supramolekulares Strukturdesign".

Puls J, Horner S and Saake B In: Heinze T and Glasser WG (eds.): *Cellulose Derivatives: Synthesis, Characterization and Nanostructures*. ACS Symposium Serie. Washington (1997).

Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, Dore C, Sticherling M, Schroder JM (2000) Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J Surg Res* 93:41-54.

Rheinwald JG and Green H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331.

Riede UN und Schaefer HE: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1995) S. 336-338.

Rogowin ZA und Galbraich LS: Die chemische Behandlung und Modifizierung der Zellulose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1983).

Ryle CM, Breitzkreutz D, Stark HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D and Fusenig NE (1989) Density- dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte cell line HaCaT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation* 40:42-54.

Sandström B (1965) Studies on cells from liver tissue cultivated in vitro. *Exp Cell Res* 37:552-568.

Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC and Dinarello CA (1990) Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75:40-47.

Schröter C, Hipler UC, Wilmer A, Kunkel W and Wollina U (2000) Generation of reactive oxygen species by *Candida albicans* in relation to morphogenesis. *Arch Dermatol Res* 292:260-264.

Shabo Y, Lotem J and Sachs L (1989) Autoregulation of interleukin 6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the differentiation of myeloid leukaemic cells. *Mol Cell Biol* 9:4109-4112.

Sporri B, Bickel M, Limat A, Waelti ER, Hunziger T and Wiesmann UN (1996) Juxtacrine stimulation of cytokine production in cocultures of human dermal fibroblasts and T-cells. *Cytokine* 8:631-635.

Tarchevsky IA and Marchenko GN: Cellulose: Biosynthesis and Structure. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona (1991)

Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie

Verlag Chemie, Weinheim (1975) 4. Auflage, Bd. 9, S. 193-210.

van Luyn MJA, van Wachem PB, Nieuwenhuis P and Jonkman MF (1992) Cytotoxicity testing of wound dressings using the methylcellulose cell culture. *Biomaterials* 13:267-275.

Wang B, Ruiz N, Pentland A and Caparon M (1997) Keratinocyte proinflammatory responses to adherent and nonadherent group A streptococci. *Infect Immun* Vol.65, No.6:2119-2126.

Waring MJ and Parsons D (2001) Physico-chemical characterisation of carboxymethylated spun cellulose fibres. *Biomaterials* 22:903-912.

Williams C (1999) An investigation of the benefits of Aquacel Hydrofibre wound dressing. *Br J Nurs* 8:676-677.

Winkler E: Funktionspolymere - ein interdisziplinäres Forschungsgebiet. In: *Klassische Polymere im Aufwind*, Vortragstagung der Fachgruppe Makromolekulare Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker, 25.-26.03.1996, Technische Universität Dresden.

Wollina U (1995) Synthetische Verbände bei kutanen Wunden. *Die Medizinische Welt* 46:363-368.

Wollina U, Knöll B, Prüfer K, Barth A, Müller D and Huschenbeck J (1996) Synthetic wound dressings - evaluation of interactions with epithelial and dermal cells in vitro. *Skin Pharmacol* 9:35-42.

Yoshizaki K, Nishimoto N, Matsumoto K, Tagoh H, Taga T, Deguchi Y, Kuritani T, Hirano T, Hashimoto K, Okada N and Kishimoto T (1990) Interleukin-6 and expression of its receptor on epidermal keratinocytes. *Cytokine* 2:381-387.

## 10. ANHANG

### **Danksagung**

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Uwe Wollina für die Überlassung des Themas sowie die umfassende Unterstützung bei der Planung der Experimente und Diskussion der Ergebnisse bedanken. Darüber hinaus gilt mein Dank seiner freundlichen und geduldigen Betreuung.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Peter Elsner für die Begleitung der Dissertation. Für die mir gewährte Unterstützung möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor der Hautklinik Jena unter der Leitung von Frau Dr. Uta-Christina Hipler bedanken, ganz besonders bei Frau Brunhilde Knöll - für die kompetente Beantwortung so vieler Fragen, ihr freundliches Weitergeben all ihrer Erfahrung bei der Zellzucht, ihren Humor und ihr Mutmachen während der experimentellen Arbeiten.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Heinze für die überaus angenehme Zusammenarbeit und die interessanten, oft Denkanstöße vermittelnden Diskussionen sowohl während der experimentellen als auch während der Auswertungsphase bedanken.

Weiterhin möchte ich Dr. med. Wolfram Kluge für die technische Unterstützung und seine guten Ratschläge bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, ohne deren langjährige und selbstverständliche Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre, Dank für ihre Liebe, ihr unerschütterliches Vertrauen, die anregenden Gespräche, die Motivation.

Zum Schluss möchte ich all denen danken, die durch ihr Interesse, nette Gesten und die vielen kleinen alltäglichen und nicht alltäglichen Dinge zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## **Lebenslauf**

### **Angaben zur Person**

Name: Kerstin Trier

Wohnort: Am Schlüfter 1, 07639 Tautenhain

Geburtsdatum und -ort: 01.07.1971 in Jena

Familienstand: nicht verheiratet, zwei Kinder

### **Schulbildung**

1978 - 1988 Polytechnische Oberschule

1988 - 1990 Erweiterte Oberschule

07.90 Abitur

### **Studium**

09.90 - 07.92 Magisterstudium Auslandsgermanistik/Anglistik an der FSU Jena, 09.91 - 04.92 Integriertes Auslandsstudium an der New Oxford University in Oxford/GB

07.92 Wechsel der Studienrichtung auf eigenen Wunsch

09.92 - 07.97 Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

12.04.1999 3. Staatsexamen

### **Berufliche Tätigkeit**

05.99 - 10.00 Erziehungsjahr

11.00 - 04.01 AiP an der Klinik für Orthopädie der FSU Jena in Eisenberg

04.01 - z.Zt. Erziehungsjahr

01.03 - z.Zt. AiP in der Neurologischen Abteilung der Moritzklinik Bad Klosterlausnitz

Tautenhain, 06.12.2002

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. U. Wollina und Prof. Dr. rer. nat. Th. Heinze,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Tautenhain, 06.12.2002

